



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ανάπτυξη βελτιστοποιημένων βακτηριακών στελεχών
για την υπερέκφραση προκαρυωτικών και
ευκαρυωτικών διαμεμβρανικών πρωτεϊνών

ΜΥΡΣΙΝΗ Κ. ΜΙΧΟΥ

Λάρισα 2020

Ανάπτυξη βελτιστοποιημένων βακτηριακών στελεχών για την υπερέκφραση προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών διαμεμβρανικών πρωτεϊνών

«Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ)»



Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Επταμελής εξεταστική επιτροπή

- **Σκρέτας Γεώργιος (Επιβλέπων)**

Ερευνητής Β', Ενζυμική και Συνθετική Βιοτεχνολογία
Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας, Εθνικό ίδρυμα Ερευνών

- **Λεωνίδας Δημήτριος**

Καθηγητής, Βιοχημεία
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

- **Χατζηνικολάου Δημήτριος**

Αναπληρωτής Καθηγητής, Μικροβιακή Βιοτεχνολογία
Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

- **Παπαδοπούλου Καλλιόπη**

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Βιοτεχνολογία Φυτών
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

- **Διαλλινάς Γεώργιος**

Καθηγητής, Μοριακή Μικροβιολογία
Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

- **Ζωγράφος Σπυρίδων**

Ερευνητής Α', Δομική Βιολογία και Χημεία
Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας, Εθνικό ίδρυμα Ερευνών

- **Καρπούζας Δημήτριος**

Καθηγητής, Περιβαλλοντική Μικροβιολογία και Βιοτεχνολογία
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΜΥΡΣΙΝΗ Κ. ΜΙΧΟΥ

Ανάπτυξη βελτιστοποιημένων βακτηριακών στελεχών
για την υπερέκφραση προκαρυωτικών και
ευκαρυωτικών διαμεμβρανικών πρωτεϊνών

Περίληψη

Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες αποτελούν μία ιδιαίτερος σημαντική και μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνών η οποία εμπλέκεται σε ένα εύρος κυτταρικών λειτουργιών. Στους ευκαρυωτικούς και προκαρυωτικούς οργανισμούς, το 20-30% των γονιδίων κωδικοποιεί για μεμβρανικές πρωτεΐνες, τονίζοντας έτσι τη μεγάλη τους σημασία. Συγκεκριμένα, οι μεμβρανικές πρωτεΐνες εμπλέκονται στη μεταφορά θρεπτικών στοιχείων, την κυτταρική σηματοδότηση και τη διατήρηση της κυτταρικής δομής. Επιπλέον, η σημαντικότητά τους διαφαίνεται από το γεγονός πως ένα μεγάλο ποσοστό μεμβρανικών πρωτεϊνών εμπλέκεται σε σοβαρές ασθένειες όπως η επιληψία, ο διαβήτης, η κυστική ίνωση, ο καρκίνος κ.α.

Όπως γίνεται κατανοητό, η γνώση της ακριβούς δομής και λειτουργίας τους, αποτελεί ύψιστη ανάγκη καθώς η εύρυθμη λειτουργία όλων των οργανισμών στηρίζεται κατά ένα πολύ μεγάλο βαθμό στις πρωτεΐνες αυτές. Η δομική και λειτουργική μελέτη τους απαιτεί σημαντικές ποσότητες απομονωμένης διαμεμβρανικής πρωτεΐνης υψηλής ποιότητας. Όμως, η ιδιαίτερος χαμηλή συγκέντρωσή τους στους ενδογενείς ιστούς όπου και εδράζονται, καθιστά ιδιαίτερος δύσκολη την απομόνωσή τους σε μεγάλες ποσότητες. Συνεπώς, η απόκτησή τους προϋποθέτει την παραγωγή τους σε ετερόλογους οργανισμούς, όπως είναι τα βακτήρια, η ζύμη, τα κύτταρα εντόμων, τα κύτταρα θηλαστικών, καθώς και τα διαγονιδιακά ζώα.

Ο οργανισμός *Escherichia coli* χρησιμοποιείται ευρέως για την παραγωγή διαμεμβρανικών πρωτεϊνών με επιτυχία. Περίπου το 20% των κατατεθειμένων γνωστών δομών στη βάση δεδομένων πρωτεϊνικών δομών (PDB) προέρχεται από

παραγωγή τους στον συγκεκριμένο οργανισμό. Παρά την ύπαρξη όμως επιτυχημένων περιπτώσεων, η χρήση του *E. coli* παραμένει μία πρόκληση καθώς η προσπάθεια παραγωγής διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, τις περισσότερες φορές, οδηγεί σε υψηλά επίπεδα σοβαρής κυτταροτοξικότητας και σε πολύ χαμηλά επίπεδα παραγόμενης πρωτεΐνης.

Έχοντας ως στόχο την ανάπτυξη *E. coli* στελεχών με την ικανότητα να αντιμετωπίζουν τις προκλήσεις της ετερόλογης παραγωγής διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, το εργαστήριό μας έχει κατασκευάσει δύο τροποποιημένα στελέχη, ονόματι *E. coli* SuptoxD και SuptoxR, τα οποία μπορούν και ανθίστανται στην υψηλή τοξικότητα που επιφέρει συχνά η παραγωγή των πρωτεϊνών αυτών και, ταυτοχρόνως, παράγουν αυξημένες ποσότητες, τόσο προκαρυωτικών όσο και ευκαρυωτικών, σωστά αναδιπλωμένων διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, μέσω της υπερεκφράσεως δύο μεμονωμένων γονιδίων του *E. coli*: του γονιδίου *djlA*, και του γονιδίου *rraA*, αντιστοίχως.

Προκειμένου να βελτιστοποιηθούν τα βακτηριακά αυτά στελέχη, προβήκαμε στην εύρεση των κατάλληλων συνθηκών υπερέκφρασης των γονιδίων *djlA* και *rraA*, καθώς και των πλέον αποτελεσματικών καλλιεργητικών συνθηκών παραγωγής, οι οποίες θα βελτιστοποιούσαν την ήδη αυξημένη παραγωγή, σωστά ενσωματωμένων και αναδιπλωμένων, διαμεμβρανικών πρωτεϊνών. Μετά την εύρεση των συνθηκών αυτών, οι οποίες οδήγησαν την ετερόλογη παραγωγή διαμεμβρανικών πρωτεϊνών στο βέλτιστο βαθμό, όχι μόνο σε επίπεδο πρωτεϊνικής ποσότητας, αλλά και ποιότητας, ακολούθησε πρωτεϊνική απομόνωση μέσω της οποίας διεπιστώθη πως οι εξεταζόμενες πρωτεΐνες, παρήχθησαν σε πολύ υψηλές ποσότητες (της τάξεως των μιλιγραμμαρίων (mg)) ποσότητα η οποία ικανοποιεί τις απαιτήσεις για περαιτέρω

μελέτες. Επιπλέον, η χρήση των βελτιστοποιημένων στελεχών SuptoxD και SuptoxR οδήγησε στην επιτυχή παραγωγή αυξημένων επιπέδων βιολογικώς ενεργής πρωτεΐνης, και συνεπώς κατάλληλης για λειτουργικές μελέτες.

Εν συνεχεία, διερευνήσαμε αν φυσικά απαντώμενες, ομόλογες πρωτεΐνες της *E. coli* DjlA, μπορούν να έχουν παρόμοιες ευεργετικές ιδιότητες με το στέλεχος SuptoxD (*E. coli* DjlA) και, επιπροσθέτως, αν κάποια εξ αυτών δρα ακόμα πιο αποτελεσματικά στην αντιμετώπιση της επαγόμενης κυτταροτοξικότητας, και στην παραγωγή ακόμα πιο αυξημένης ποσότητας διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, συγκριτικά με το στέλεχος 1^{ns} γενιάς SuptoxD. Έχοντας αναζητήσει και βρει ομόλογες, της *E. coli* DjlA, πρωτεΐνες οι οποίες παρουσίαζαν χαμηλά, μεσαία και υψηλά επίπεδα ομοιότητας με αυτή, ακολούθησε συγκριτική μελέτη τους. Καθώς διαπιστώθηκε πως η πλειοψηφία των DjlA πρωτεϊνών διακρίνονταν από την ικανότητα να αντιμετωπίζουν την επαγόμενη κυτταροτοξικότητα, και κάποιες εξ αυτών να ξεχωρίζουν για την επιτυχή παραγωγή σωστά ενσωματωμένων διαμεμβρανικών πρωτεϊνών σε αυξημένες ποσότητες, επιλέχθηκε η πρωτεΐνη DjlA που προερχόταν από τον οργανισμό *Salmonella enterica*, η οποία ξεπερνούσε τις ήδη υψηλές αποδόσεις της *E. coli* DjlA. Χρησιμοποιώντας την πρωτεΐνη αυτή, δημιουργήθηκε το στέλεχος 2^{ns} γενιάς, SuptoxD2.0. Η χρήση του στελέχους αυτού απέφερε εξαιρετικά υψηλές ποσότητες διαμεμβρανικής ενεργής πρωτεΐνης, υψηλής ποιότητας, σε αναδιπλωμένη και μη συσσωματωμένη μορφή, καθιστώντας το ως ιδανικό σύστημα ετερόλογης παραγωγής διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ευρέως από την κοινότητα της βιοτεχνολογίας.

Abstract

Membrane proteins (MPs) constitute a large family of proteins involved in a range of cellular functions. In eukaryotic and prokaryotic organisms, about 20-30% of their genes encode for MPs, pointing out their great importance. Specifically, MPs participate in the transport of nutrients, cellular signaling and the maintenance of cellular structure. Their great importance is reflected by the fact that a wide variety of MPs are involved in numerous devastating human diseases, such as epilepsy, diabetes, cystic fibrosis, hypertension, cancer, and many more.

The understanding of MP structure and function is very important as the well-being of an organism greatly relies on them. The structural and functional studies of MPs require substantial quantities of pure and high-quality protein. However, as their natural abundance in their native tissues is really low, significant amounts of isolated protein are typically acquired after recombinant overexpression in heterologous hosts, such as bacteria, yeasts, insect cells, mammalian cells or transgenic animals.

Escherichia coli has been historically used for the production of MPs with great success as ~20% of all MP structures deposited in the Protein Data Bank (PDB) have utilized MP material produced recombinantly in *E. coli*. Despite these success stories, the use of *E. coli* remains a challenge as recombinant MP production usually leads to high levels of toxicity for the host and very little membrane- incorporated protein per cell, with a small portion of it in a well-folded and functional form.

With the ultimate goal to develop new *E. coli* strains capable of dealing with the challenges of recombinant MP production, we have recently constructed two engineered strains, called SuptoxD and SuptoxR, which upon co-expression of the effector genes *djlA* and *rraA*, respectively, can suppress MP-induced toxicity and they are able to produce enhanced quantities of well-folded recombinant MPs, of both prokaryotic and eukaryotic origin.

In this thesis, we systematically looked for gene overexpression and culturing conditions that maximize the accumulation of membrane-integrated and well-folded recombinant MPs in these *E. coli* SuptoxD and SuptoxR. Having optimized production conditions that lead to enhanced quantities of high-quality recombinant homogeneous MPs, sufficient for functional and structural studies, we proceeded to purification. The purification revealed that tested MPs were produced in high protein quantity (mg), suitable for further studies. Moreover, using the PELDOR technique, we confirmed the correct folding and structural integrity of the protein. Also, we have found that, under optimal conditions, SuptoxD and SuptoxR achieve greatly enhanced recombinant production of functional membrane proteins.

Furthermore, we have investigated whether homologous DjIA proteins from other bacteria can also function as suppressors of MP-induced toxicity and as enhancers of recombinant MP production in *E. coli* similarly to the *E. coli* DjIA, and also, if we could identify any DjIA variant with better performance, compared to *E. coli* DjIA. We identified and compared several homologous DjIA proteins with high (>85), intermediate (60-85%) and low (<60%) levels of sequence similarity to the *E. coli* DjIA of SuptoxD. After finding out that the majority of DjIA variants has beneficial effects by functioning as efficient suppressors of MP-induced toxicity

and enhancers of recombinant well-folded MP production in *E. coli*, we picked the natural DjlA variant of *S. enterica*. By using this improved-performance DjlA variant from *S. enterica*, we have constructed the second-generation *E. coli* strain, called SuptoxD2.0, the use of which enables the production of high-quality and quantity monodisperse recombinant MPs, well-folded, non-aggregated, making this strain an ideal expression host for recombinant membrane protein production, and also a valuable tool for biotechnology field.

Λέξεις-Κλειδιά

- *Escherichia coli*
- Υπερπαραγωγή διαμεμβρανικών πρωτεϊνών
- Τοξικότητα
- DjlA
- RraA
- *E. coli* SuptoxD
- *E. coli* SuptoxR
- *E. coli* SuptoxD2.0

ΜΥΡΣΙΝΗ Κ. ΜΙΧΟΥ

Λάρισα, 2020

Ανάπτυξη βελτιστοποιημένων βακτηριακών στελεχών για την
υπερέκφραση προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών διαμεμβρανικών
πρωτεϊνών

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σχολή Επιστημών Υγείας

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Αριθμός εισαγωγικών σελίδων: 24

Αριθμός συνολικών σελίδων: 209

Αριθμός σχημάτων: 44

Αριθμός πινάκων: 5

Αριθμός βιβλιογραφικών αναφορών: 168

Πρόλογος

Ο βασικός στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η ανάπτυξη βελτιστοποιημένων βακτηριακών στελεχών για την υπερέκφραση προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών διαμεμβρανικών πρωτεϊνών. Προς αυτή την κατεύθυνση, διερευνήθηκαν και προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες, τόσο αυτές που χαρακτηρίζουν τη διαδικασία της καλλιέργειας των *E. coli* στελεχών SuptoxD και SuptoxR, όσο και αυτές της υπερέκφρασης των γονιδίων *djlA* και *rraA*, που αυτά φέρουν αντιστοίχως, ούτως ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη απόδοση των στελεχών κατά την υπερπαραγωγή διαμεμβρανικών πρωτεϊνών. Εν συνεχεία, αναζητήθηκαν φυσικώς απαντώμενα *djlA* γονίδια, ομόλογα της *E. coli djlA*, των οποίων η υπερέκφραση να αντιμετωπίζει επιτυχώς την επαγόμενη κυτταροτοξικότητα. Βάσει του βαθμού κατευνασμού της τοξικότητας, της αύξησης του κυτταρικού πληθυσμού και της ογκομετρικής αύξησης της παραγόμενης, σωστά αναδιπλωμένης και ενσωματωμένης στη μεμβράνη πρωτεΐνης, επιλέχθηκε το γονίδιο *djlA* του οργανισμού *Salmonella enterica* και κατασκευάστηκε το δεύτερης γενιάς *E. coli* στέλεχος SuptoxD2.0. Τα στελέχη SuptoxD, SuptoxR και SuptoxD2.0 μπορούν και παράγουν διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, τόσο προκαρυωτικής όσο και ευκαρυωτικής προελεύσεως, σε υψηλή ποσότητα (mg) και ποιότητα, κατάλληλες για περαιτέρω λειτουργικές και δομικές μελέτες.

Η συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο διάστημα των ετών 2016-2020 στο εργαστήριο Ενζυμικής και Συνθετικής Βιοτεχνολογίας στο Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών σε συνεργασία με το τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την

επίβλεψη και καθοδήγηση του Δρ. Γεωργίου Σκρέτα. Χρηματοδοτήθηκε από τη χορήγηση υποτροφίας του Ιδρύματος Κρατικών Υποτροφιών με σκοπό την εκπόνηση διδακτορικής διατριβής στην Ελλάδα στο πλαίσιο της δράσης 10.2.2.03.01 με τίτλο «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας» (1ος κύκλος) του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» 2014-2020 (MIS 5000432), που συγχρηματοδοτείται από το Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο (Ε.Κ.Τ.) και το Ελληνικό Δημόσιο. Συν-χρηματοδοτήθηκε από το έργο «Synthetic Biology: from omics technologies to genomic engineering (OMIC-ENGINE)» με κωδικό ΟΠΣ «MIS 5002636», το οποίο έχει ενταχθεί στη Δράση «Ενίσχυση των Υποδομών Έρευνας και Καινοτομίας» του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανταγωνιστικότητα Επιχειρηματικότητα και Καινοτομία» (ΕΠΑνΕΚ), στο πλαίσιο του ΕΣΠΑ 2014-2020, συγχρηματοδοτείται από το Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης (ΕΤΠΑ), καθώς κι από το έργο «Υποστήριξη ερευνητών με έμφαση στους νέους ερευνητές-κύκλος Β» με κωδικό ΟΠΣ «MIS 5050546» του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη ανθρώπινου δυναμικού, εκπαίδευση και δια βίου μάθηση», στο πλαίσιο του ΕΣΠΑ 2014-2020.

Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στον επιβλέποντά μου, Γεώργιο Σκρέτα, ερευνητή Β' στο Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε από την πρώτη στιγμή, τη συνεχή και πολύτιμη καθοδήγησή του, την πίστη του σε εμένα, και το συνεχές του ενδιαφέρον. Επίσης, τα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής, τον Καθηγητή στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Δημήτριο Λεωνίδα, καθώς και τον Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών Δημήτριο Χατζηνικολάου για τη βοήθεια τους καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα παλιά και νέα μέλη του εργαστηρίου μας στο Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας, για την αγάπη, τη βοήθεια και την υποστήριξη τους καθ' όλη τη διάρκεια. Συγκεκριμένα, τις μεταδιδακτορικές ερευνήτριες Δήμητρα Γιαλαμά, Δάφνη Δεληβοριά, και Δήμητρα Ζαραφέτα, τον μεταδιδακτορικό ερευνητή Ηλία Μάτη, τη Σταματία Μπέλλου και την Άρτεμις Γιαννακοπούλου για την καθημερινή τους υποστήριξη, αγάπη και τις πολύτιμες τους συμβουλές. Επιπλέον, τον Άγγελο Στέργιο και τους υποψήφιους διδάκτορες Έλενα Βασιλοπούλου και Άρη Μίχογλου που έκαναν το ταξίδι αυτό ακόμα πιο συναρπαστικό.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον ερευνητή Χρήστο Πλιώτα και το μεταδιδακτορικό ερευνητή Χαράλαμπο Καψάλη για τη τόσο ευχάριστη και πολύτιμη συνεργασία μας. Επί προσθέτως, τον Δρ. Ζωγράφο, την Δρ. Τσιτσάνου και την υποψήφια διδάκτορα Παναγιώτα Λίγγρη για τη φιλοξενία στο εργαστήριο τους

στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών και την πολύτιμη βοήθεια τους για την υλοποίηση των πειραμάτων χρωματογραφίας και όχι μόνο. Επίσης, όλα τα μέλη του εργαστηρίου του Δρ. Ξενάκη για τη σημαντικότερη βοήθεια όλα αυτά τα χρόνια. Δε θα μπορούσα να ξεχάσω την Ευθυμία Πάππου για τις πολύ ευχάριστες και πολύτιμες ώρες που περάσαμε μαζί στο μηχάνημα του FACS, το συνεχές της χαμόγελο και τη σύντομη αλλά ακριβή μας φιλία.

Τέλος, την οικογένεια μου, και συγκεκριμένα, τους γονείς μου και την αδερφή μου, γιατί χωρίς την αγάπη και την πίστη τους σε εμένα, δε θα είχα φθάσει μέχρι εδώ. Επί προσθέτως, τη δεύτερή μου οικογένεια, τους φίλους μου, για την αμέριστη αγάπη, υποστήριξη, και τις πολύτιμες συμβουλές τους εδώ και πολλά πολλά χρόνια, καθώς και το σκύλο μου Lord για τις αμέτρητες βόλτες που του στέρησα, και τις ώρες που πέρασε να με περιμένει.

Δημοσιεύσεις σε επιστημονικά περιοδικά

1. Gialama, D., Kostelidou, K., Michou, M., Delivoria, D.C., Kolisis, F.N., Skretas, G. 2016.
Development of *Escherichia coli* strains that withstand membrane protein-induced toxicity and achieve high-level recombinant membrane protein production.
ACS Synthetic Biology., 2017 doi:6(2):284-300
2. Gialama, D., Delivoria, D.C., Michou, M., Giannakopoulou, A., Skretas, G. 2017.
Functional Requirements for DjlA- and RraA-mediated enhancement of recombinant membrane protein production in the engineered *Escherichia coli* strains SuptoxD and SuptoxR.
Journal of Molecular Biology., 2017 doi:429(12):1800-1816
3. Michou, M., Kapsalis, C., Pliotas, C., Skretas, G. 2019.
Optimization of recombinant membrane protein production in the engineered *Escherichia coli* strains SuptoxD and SuptoxR.
ACS Synthetic Biology., 2019 doi:8(7):1631-1641
4. Michou, M., Stergios, A., Skretas, G. 2020.
SuptoxD2.0: A second-generation engineered *Escherichia coli* strain achieving further enhanced levels of recombinant membrane protein production.
Biotechnology and Bioengineering., 2020 doi: 10.1002/bit.27378
5. Michou, M., Delivoria, D.C., Skretas, G. 2020.
High-level Production of Recombinant Membrane Proteins Using the Engineered *Escherichia coli* Strains SuptoxD and SuptoxR.
Bio-protocol., 2020 doi: 10.21769/bioprotoc.3710

Κατάλογος σχημάτων και πινάκων

Σχήμα 1: Σχηματική αναπαράσταση της δομής του κυτταρικού φακέλου του βακτηρίου <i>Escherichia coli</i>	- 28 -
Σχήμα 2 : Σχηματική αναπαράσταση του ποσοστού των φαρμάκων που στοχεύουν σε GPCRs στην παγκόσμια αγορά.	- 29 -
Σχήμα 3: Διάγραμμα κατανομής ανά έτος των κατατεθειμένων δομών στη βάση δεδομένων πρωτεϊνικών δομών (PDB) μέχρι και τον Απρίλιο του 2020.....	- 31 -
Σχήμα 4: Διάγραμμα κατανομής (από το έτος 1985 που κατατέθηκε η πρώτη δομή διαμεμβρανικής πρωτεΐνης) των κατατεθειμένων μοναδικών δομών μεμβρανοπρωτεϊνών στη βάση δεδομένων μέχρι και τον Απρίλιο του 2020.	- 32 -
Σχήμα 5: Παραλαβή και ενσωμάτωση νέων πρωτεϊνών με συν-μεταφραστικό τρόπο στο βακτήριο <i>Escherichia coli</i>	- 43 -
Σχήμα 6: Η υπερπαραγωγή της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης BR2 προκαλεί σοβαρή κυτταροτοξικότητα.....	- 50 -
Σχήμα 7: Τα γονίδια <i>djlA</i> και <i>rraA</i> , κατά την υπερέκφρασή τους, δρουν ως καταστολείς της κυτταροτοξικότητας, προάγοντας την κυτταρική ανάπτυξη. ..	- 54 -
Σχήμα 8: Η υπερέκφραση των γονιδίων <i>djlA</i> και <i>rraA</i> κατά την παραγωγή της χιμαιρικής πρωτεΐνης BR2-GFP στον οργανισμό <i>E. coli</i> βοηθούν σημαντικά την κυτταρική αύξηση της παραγωγής της διαδιαμεμβρανικής πρωτεΐνης.....	- 56 -
Σχήμα 9: Απεικόνιση των <i>E. coli</i> στελεχών SuptoxD και SuptoxR.....	- 59 -
Σχήμα 10: Οι ευεργετικές ιδιότητες των στελεχών SuptoxD και SuptoxR εφαρμόζονται σε ένα εύρος διαφορετικών διαμεμβρανικών πρωτεϊνών.	- 60 -
Σχήμα 11: Τα στελέχη SuptoxD και SuptoxR ξεπερνούν σε αποδόσεις τα εμπορικά διαθέσιμα στελέχη.	- 64 -
Σχήμα 12: Σχηματική απεικόνιση της δομής των 3 διαφορετικών ομάδων των J-πρωτεϊνών.	- 65 -
Σχήμα 13: Σχηματική απεικόνιση της δομής της πρωτεΐνης Dj1A.	- 68 -
Σχήμα 14: Σχηματική απεικόνιση των παραλλαγών της πρωτεΐνης Dj1A	- 70 -
Σχήμα 15: Η ύπαρξη ακέραιης της Dj1A κρίνεται απαραίτητη για την αντιμετώπιση της κυτταροτοξικότητας.....	- 73 -

Σχήμα 16: Η επιτυχής αλληλεπίδραση της DjlA με την DnaK οδηγεί σε επιτυχή υπερέκφραση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών.	- 74 -
Σχήμα 17: Η DjlA είναι η μοναδική J-πρωτεΐνη με ευεργετικές ιδιότητες στην αντιμετώπιση της κυτταροτοξικότητας και στην επιτυχή υπερέκφραση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών	- 78 -
Σχήμα 18: Οι ευεργετικές ιδιότητες της DjlA κατά την υπερέκφραση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών δεν πραγματοποιείται μέσω της ενεργοποίησης της αντίδρασης στρες Rcs.	- 80 -
Σχήμα 19: Πιθανό μοντέλο δράσης της πρωτεΐνης DjlA	- 81 -
Σχήμα 20: Χαρακτηριστικά των στελεχών SuptoxD και SuptoxR.....	- 86 -
Σχήμα 21: Προσδιορισμός βέλτιστων επιπέδων της έκφρασης του γονιδίου <i>djlA</i> στα κύτταρα SuptoxD ρυθμίζοντας τη συγκέντρωση του επαγωγέα L(+) αραβινόζη.-	91 -
Σχήμα 22: Προσδιορισμός βέλτιστων επιπέδων της έκφρασης του γονιδίου <i>rraA</i> στα κύτταρα SuptoxR ρυθμίζοντας τη συγκέντρωση του επαγωγέα L(+) αραβινόζη.-	95 -
Σχήμα 23: Βελτιστοποίηση της ανασυνδυασμένης παραγωγής διαμεμβρανικών πρωτεϊνών στα κύτταρα SuptoxD ρυθμίζοντας τα επίπεδα ανυδροτετρακυκλίνης (aTc).	- 100 -
Σχήμα 24: Βελτιστοποίηση της ανασυνδυασμένης παραγωγής διαμεμβρανικών πρωτεϊνών στα κύτταρα SuptoxR ρυθμίζοντας τα επίπεδα ανυδροτετρακυκλίνης (aTc)	- 102 -
Σχήμα 25: Προσδιορισμός βέλτιστων συνθηκών θερμοκρασίας και διάρκειας υπερέκφρασης διαμεμβρανικών πρωτεϊνών στα <i>E.coli</i> στελέχη SuptoxD και SuptoxR.	- 107 -
Σχήμα 26: Χαρακτηριστικά των ροδοψινών.	- 110 -
Σχήμα 27: Η χρήση των <i>E. coli</i> στελεχών SuptoxD και SuptoxR παράγουν αυξημένες ποσότητες λειτουργικής HtdR πρωτεΐνης.	- 113 -
Σχήμα 28: Το στέλεχος SuptoxD παράγει εξαιρετικά υψηλά ποσά απομονωμένης διαμεμβρανικής πρωτεΐνης.	- 119 -
Σχήμα 29: Απομόνωση της πρωτεΐνης BR2 από <i>E.coli</i> κύτταρα SuptoxD.	- 120 -
Σχήμα 30: Το στέλεχος SuptoxR παράγει εξαιρετικά υψηλά ποσά απομονωμένης διαμεμβρανικής πρωτεΐνης.	- 123 -
Σχήμα 31: Απομόνωση της MscL από <i>E. coli</i> κύτταρα SuptoxR.	- 123 -

Σχήμα 32: Το στέλεχος SuptoxR παράγει σωστά αναδιπλωμένη διαμεμβρανική πρωτεΐνη MscL στην αναμενόμενη ολιγομερή διαμόρφωση.	- 125 -
Σχήμα 33: Συγκριτική ανάλυση των αμινοξικών αλληλουχιών όλων των εξεταζόμενων ομόλογων, με την <i>E. coli</i> DjlA, πρωτεϊνών.....	- 132 -
Σχήμα 34: Η πλειοψηφία των ομόλογων, της <i>E. coli</i> DjlA, πρωτεϊνών DjlA δρουν αποτελεσματικά ως καταστολείς της κυτταροτοξικότητας, προάγοντας την κυτταρική ανάπτυξη.	- 138 -
Σχήμα 35: Η συμπαραγωγή συγκεκριμένων DjlA πρωτεϊνών αυξάνει την ανά κύτταρο παραγωγή, ενσωματωμένης στη μεμβράνη, BR2-GFP πρωτεΐνης.....	- 140 -
Σχήμα 36: Η χρήση των πρωτεϊνών DjlA που προέρχονται από διαφορετικά βακτήρια αυξάνουν σημαντικά την ογκομετρική παραγωγικότητα διαμεμβρανικής πρωτεΐνης.	- 141 -
Σχήμα 37: Η συμπαραγωγή των περισσότερων DjlA πρωτεϊνών αυξάνουν σημαντικά τα επίπεδα παραγόμενης και ενσωματωμένης στη μεμβράνη πρωτεΐνης BR2-GFP. -	142 -
Σχήμα 38: Τα στελέχη SuptoxD και SuptoxD2.0.....	- 143 -
Σχήμα 39: Το στέλεχος SuptoxD2.0 επιτυγχάνει ακόμα πιο αυξημένα επίπεδα παραγωγής διαμεμβρανικών πρωτεϊνών.	- 149 -
Σχήμα 40: Το στέλεχος SuptoxD2.0 επιτυγχάνει τη παραγωγή ακόμα πιο αυξημένης ποσότητας λειτουργικής πρωτεΐνης συγκριτικά με το στέλεχος SuptoxD.....	- 153 -
Σχήμα 41: Το στέλεχος SuptoxD2.0 παράγει υψηλά ποσά ενεργής και καθαρής πρωτεΐνης.	- 156 -
Σχήμα 42: Σχηματική απεικόνιση του σημείου ένθεσης του γονιδίου <i>djlA</i> εντός του χρωμοσώματος του οργανισμού <i>E. coli</i>	- 159 -
Σχήμα 43: Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pBAD18DjlA.	- 160 -
Σχήμα 44: Σχηματική απεικόνιση του τμήματος της ένθεσης.	- 162 -
Πίνακας 1: Μεμβρανικές πρωτεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν	- 172 -
Πίνακας 2: Πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν	- 173 -
Πίνακας 3: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή	- 176 -
Πίνακας 4: Ποσοστά επιθυμητής μεταλλαξιγένεσης και ποσότητες αντιδραστηρίων-	180 -
Πίνακας 5: Βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν	- 182 -

Κατάλογος συντομογραφιών

aTc	Anhydrotetracycline
BEVS	Baculovirus Expression Vector System
BR2	Bradykinin receptor 2
CB2	Peripheral cannabinoid receptor
DDM	n-dodecyl β -D-maltoside
DEER	Double electron electron resonance
DjlA	DnaJ-like protein A
DDM	n-decyl- β -d-maltoside
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Fos14	Fos-choline-14
GFP	Green Fluorescent Protein
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
GPCRs	G-protein-coupled receptors
HPD	His-Pro-Asp tripeptide
Hsp40	Heat shock proteins 40
Hsp70	Heat shock proteins 70
HtdR	Haloterrigena turkmenica deltarhodopsin
IMAC	Immobilized metal affinity chromatography
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
LB	Luria-Bertani
MPs	Membrane Proteins
MscL	Large conductance mechanosensitive ion channel
MTSSL	S-(2,2,5,5- tetramethyl-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl) methylmethane-sulfonothioate
NLS	N-lauroylsarcosine
NTRI (D03)	Neurotensin receptor 1 (variant D03)
OG	n-octyl- β -d-glucopyranoside
PBS	Phosphate-buffered saline
PDB	Protein data bank
PELDOR	Pulsed electron-electron double resonance
PVDF	Polyvinylidene fluoride
RraA	Regulator of ribonuclease activity A
SDS PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEC	Size-exclusion chromatography
SEM	Standard error of the mean
SRP	Signal recognition particle
TBST	Tris- buffered saline + 0.1% Tween-20
TMD	Transmembrane domain

Κατάλογος περιεχομένων

Επταμελής εξεταστική επιτροπή.....	- 3 -	
Περίληψη	- 5 -	
Abstract.....	- 8 -	
Λέξεις-Κλειδιά	- 11 -	
Πρόλογος	- 13 -	
Ευχαριστίες.....	- 15 -	
Δημοσιεύσεις σε επιστημονικά περιοδικά	- 17 -	
Κατάλογος σχημάτων και πινάκων.....	- 18 -	
Κατάλογος συντομογραφιών.....	- 21 -	
Κατάλογος περιεχομένων	- 22 -	
Κεφάλαιο 1 - Διαμεμβρανικές πρωτεΐνες.....	- 26 -	
1.1 Χαρακτηριστικά, κατηγορίες και λειτουργικός ρόλος.....	- 26 -	
1.2 Η σημασία των μεμβρανοπρωτεϊνών για τη φαρμακευτική βιομηχανία .	- 29 -	
1.3 Προκλήσεις που σχετίζονται με τη δομική ανάλυση των μεμβρανοπρωτεϊνών	- 31 -	
1.4 Υπερέκφραση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών	- 34 -	
Κεφάλαιο 2 - Το βακτήριο <i>Escherichia coli</i> ως σύστημα υπερέκφρασης	διαμεμβρανικών πρωτεϊνών	- 38 -
2.1 Χαρακτηριστικά του <i>Escherichia coli</i>	- 38 -	
2.2 Βιογένεση και αναδιπλώση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών στα βακτήρια ...	- 39 -	
2.3 Το πρόβλημα της κυτταροτοξικότητας.....	- 44 -	
2.4. Τα υπάρχοντα στελέχη <i>E. coli</i>	- 45 -	
Κεφάλαιο 3 - Τα στελέχη SuptoxD και SuptoxR.....	- 49 -	
3.1 Η ανάπτυξη των στελεχών SuptoxD και SuptoxR.....	- 49 -	

3.2 Τα SuptoxD και SuptoxR ξεπερνούν σε αποδόσεις τα υπάρχοντα εμπορικά στελέχη.....	- 61 -
3.3 Τα χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών DjlA και RraA.....	- 65 -
3.3.1 DjlA: μία J-πρωτεΐνη μοναδικών ιδιοτήτων.....	- 65 -
3.3.2 RraA: μία πρωτεΐνη-ρυθμιστής με ιδιαίτερο ενδιαφέρον.....	- 82 -
Κεφάλαιο 4 - Βελτιστοποίηση συνθηκών υπερέκφρασης διαμεμβρανικών πρωτεϊνών στα στελέχη SuptoxD και SuptoxR.....	- 85 -
4.1 Βελτιστοποίηση της παραγωγικότητας των στελεχών SuptoxD και SuptoxR σε ανασυνδυασμένες μεμβρανοπρωτεΐνες ρυθμίζοντας τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων-καταστολέων <i>djlA</i> και <i>rraA</i>	- 87 -
4.2 Βελτιστοποίηση της παραγωγικότητας των στελεχών SuptoxD και SuptoxR σε ανασυνδυασμένες μεμβρανοπρωτεΐνες ρυθμίζοντας τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που τις κωδικοποιούν.....	- 96 -
4.3 Βελτιστοποίηση της παραγωγικότητας των στελεχών SuptoxD και SuptoxR σε ανασυνδυασμένες μεμβρανοπρωτεΐνες ρυθμίζοντας τις συνθήκες βακτηριακής καλλιέργειας.....	- 103 -
4.4 Τα στελέχη SuptoxD και SuptoxR παράγουν επιτυχώς αυξημένα επίπεδα απομονωμένης λειτουργικής διαμεμβρανικής πρωτεΐνης.....	- 108 -
4.5 Η χρήση των στελεχών SuptoxD και SuptoxR αποφέρει υψηλές αποδόσεις απομονωμένης διαμεμβρανικής πρωτεΐνης, ποιοτικά κατάλληλης για βιοχημικές και δομικές μελέτες.....	- 114 -
Κεφάλαιο 5 - Κατασκευή βελτιωμένου στελέχους <i>E. coli</i> SuptoxD 2^{ns} γενιάς (SuptoxD2.0).....	- 127 -
5.1 Προσέγγιση κατασκευής βελτιωμένου στελέχους <i>E. coli</i> SuptoxD στελέχους 2 ^{ns} γενιάς.....	- 127 -
5.2 Επιλογή ομόλογων πρωτεϊνών της <i>E. coli</i> DjlA για περαιτέρω μελέτη..	- 127 -
5.3 Σύγκριση της αποτελεσματικότητας φυσικών παραλλαγών της <i>E. coli</i> DjlA στο να αντιμετωπίζουν την κυτταροτοξικότητα και να προάγουν την υπερέκφραση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών.....	- 133 -
5.4 Ανάπτυξη του στελέχους 2 ^{ns} γενιάς SuptoxD2.0.....	- 142 -
5.5 Οι ευεργετικές ιδιότητες του στελέχους 2 ^{ns} γενιάς SuptoxD2.0 μπορούν να εφαρμοστούν σε διαμεμβρανικές πρωτεΐνες διαφορετικών χαρακτηριστικών-	144
5.6 Το στέλεχος <i>E. coli</i> SuptoxD2.0 παράγει αυξημένες ποσότητες υψηλής ποιότητας και ενεργούς διαμεμβρανικής πρωτεΐνης συγκριτικά με το αρχικό στέλεχος SuptoxD.....	- 150 -

Κεφάλαιο 6 – Τρέχουσες μελέτες- Μελλοντικές Προτάσεις.....	- 157 -
6.1 Ανάπτυξη στελεχών SuptoxD* και SuptoxD2.0*	- 157 -
6.2 Ανάπτυξη περαιτέρω βελτιστοποιημένου στελέχους τρίτης γενιάς SuptoxD	
3.0.....	- 163 -
Κεφάλαιο 7 - Συμπεράσματα μελέτης.....	- 166 -
Κεφάλαιο 8 - Υλικά και Μέθοδοι	- 168 -
8.1 Χημικά και αντιδραστήρια	- 168 -
8.2 Εύρεση και ανάλυση των εξεταζόμενων Dj1A αλληλουχιών	- 169 -
8.3 Κατασκευή πλασμιδίων	- 170 -
8.4 Τυχαία μεταλλαξιγένεση μέσω επιρρεπούς-σε-σφάλμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (error-prone PCR).....	- 178 -
8.5 Ενσωμάτωση γονιδίου στο γονιδιωματικό DNA	- 181 -
8.6 Βακτηριακά Στελέχη.....	- 182 -
8.7 Υπερέκφραση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών σε υγρές καλλιέργειες.....	- 184 -
8.8 Μέτρηση φθορισμού ανά όγκο καλλιέργειας σε πιάτα 96 πηγαδιών	- 185 -
8.9 Μέτρηση φθορισμού ανά κύτταρο με χρήση φθορισμο-ενεργοποιούμενου κυτταροδιαχωριστή κυτταρομετρίας ροής (fluorescence-activated cell sorter, FACS).....	- 185 -
8.10 Απομόνωση μεμβρανών	- 186 -
8.11 Απομόνωση ροδοψίνης από κυτταρικές μεμβράνες και ποσοτικοποίηση- 186	-
8.12 Απομόνωση ροδοψίνης με χρήση χρωματογραφίας συγγένειας και ταχείας υγρής χρωματογραφίας πρωτεϊνών (σύστημα AKTA-FPLC)	- 187 -
8.13 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE), ανάλυση ενδοπηκτικού φθορισμού (in-gel fluorescence analysis) και ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blot)...	- 188 -
8.14 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων	- 190 -
Κεφάλαιο 9 - Βιβλιογραφία	- 191 -
Παράρτημα.....	- 201 -

Κεφάλαιο 1 - Διαμεμβρανικές πρωτεΐνες

1.1 Χαρακτηριστικά, κατηγορίες και λειτουργικός ρόλος

Οι μεμβρανικές εντοπίζονται στις μεμβράνες των κυττάρων, όπου και εμπλέκονται σε ένα μεγάλο εύρος σημαντικών διεργασιών. Οι πρωτεΐνες αυτές συνήθως αποτελούνται από πολλαπλά τμήματα, κάποια εκ των οποίων είναι υδρόφοβα και ενσωματωμένα μέσα στη μεμβράνη, ενώ άλλα, με υδρόφιλες ιδιότητες, εκτίθενται στο υδατικό περιβάλλον¹. Βασικό στοιχείο διαφοροποίησης των πρωτεϊνών αυτών αποτελεί το εάν διαπερνούν τη μεμβράνη πλήρως ή μερικώς, οπότε και αποκαλούνται διαμεμβρανικές, ή εάν συνδέονται περιφερειακώς μαζί της μέσω αλληλεπίδρασης τους με τα λιπίδια της μεμβράνης, στην οποία περίπτωση περιφερειακές μεμβρανικές πρωτεΐνες². Από δομικής απόψεως, οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: (i) τις α-ελικοειδείς, οι οποίες αποτελούνται από διαμεμβρανικές περιοχές με διαμόρφωση α-έλικας³ (ii) τα β-βαρέλια, τα οποία βρίσκονται συνήθως στην εξωτερική μεμβράνη Gram αρνητικών βακτηρίων ή μιτοχονδρίων και χλωροπλαστών⁴, και χρησιμοποιούνται ως σημεία πρόσδεσης βακτηριοφάγων και βακτηριακών τοξινών⁵ και οι οποίες πρωτεΐνες αποτελούνται από διαμεμβρανικές περιοχές με διαμόρφωση β-βαρελιού (Σχήμα 1). Εφεξής, η χρήση της φράσης μεμβρανικές πρωτεΐνες ή μεμβρανοπρωτεΐνες θα αναφέρεται σε α-ελικοειδείς μεμβρανικές πρωτεΐνες καθώς αυτές αποτέλεσαν το αντικείμενο της παρούσας διατριβής.

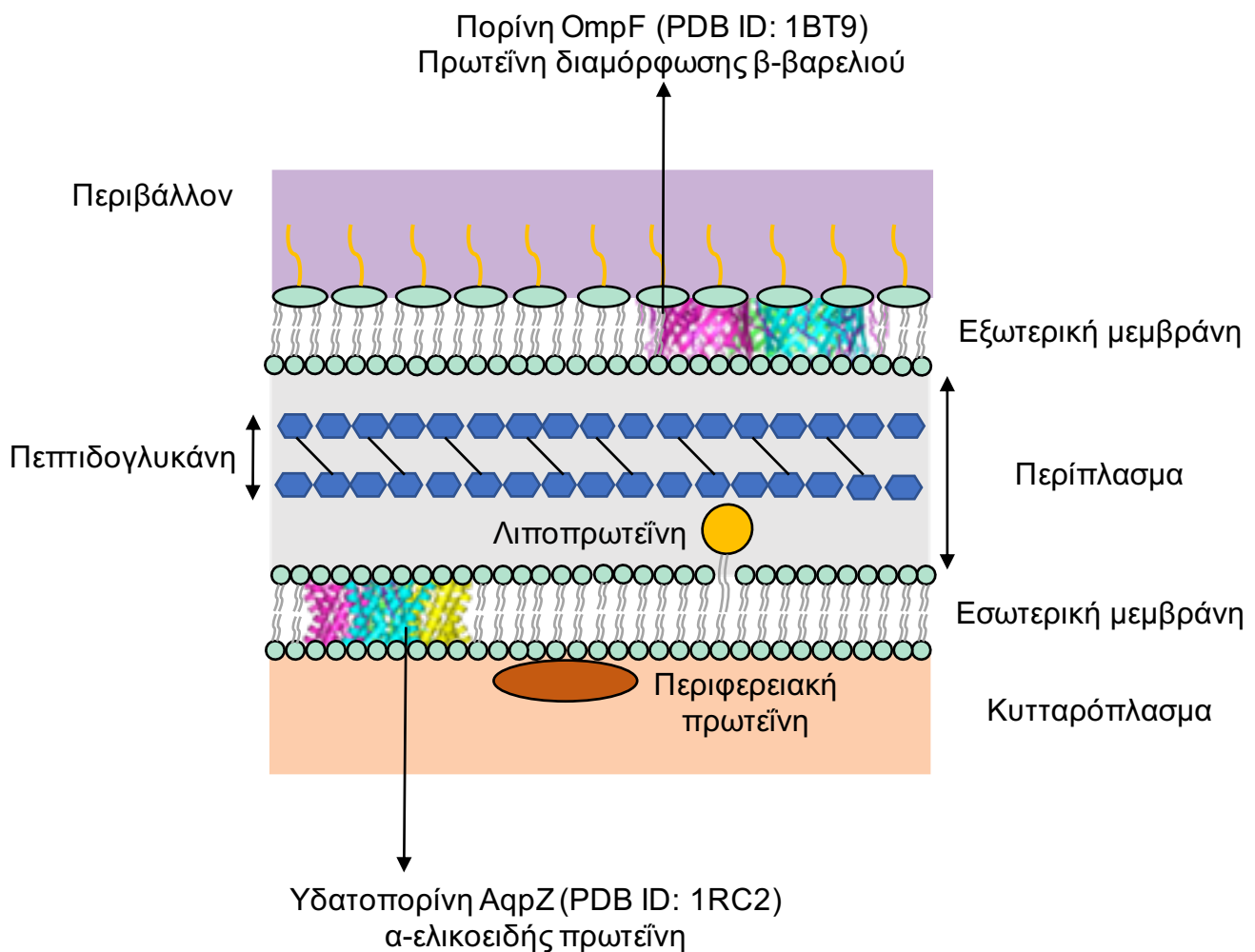
Από λειτουργικής απόψεως, οι μεμβρανικές πρωτεΐνες εμπλέκονται, μεταξύ πολλών άλλων διεργασιών, στη μεταφορά ιόντων και θρεπτικών στοιχείων, στη σηματοδότηση-αναγνώριση μεταξύ των κυττάρων, καθώς επίσης κάποιες εξ αυτών έχουν και ενεργό ρόλο στην ενεργειακή τροφοδότηση, και στη δομική συγκρότηση των κυττάρων. Ταξινομούνται σε μεταφορείς, κανάλια ιόντων/νερού, σε ένζυμα και υποδοχείς. Στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια εντοπίζονται παντού μέσα στο κύτταρο⁶.

Οι μεμβρανοπρωτεΐνες-μεταφορείς διαπερνούν τη μεμβράνη και δημιουργούν ένα αρκετά περίπλοκο σύστημα αντλιών και καναλιών, μέσω του οποίου μπορεί και επιτυγχάνεται η μεταφορά σημαντικών για την επιβίωση του κυττάρου θρεπτικών στοιχείων, καθώς επίσης αποβάλλονται παραπροϊόντα του μεταβολισμού του κυττάρου. Τέλος, μέσω αυτών των μεταφορέων, το κύτταρο υποβοηθάται στο να «αντιλαμβάνεται» τις περιβαλλοντικές συνθήκες ⁷.

Τα κανάλια ιόντων αποτελούν πρωτεΐνες, οι οποίες διευκολύνουν τη διάχυση των ιόντων κατά μήκος της μεμβράνης: προσφέρουν ένα εξαιρετικά υψηλής αγωγιμότητας υδρόφιλο μονοπάτι στο εσωτερικό υδρόφοβο τμήμα της μεμβράνης. Η αλλαγή της διαμόρφωσης ενός καναλιού σε κλειστό ή ανοικτό είναι αυτή που καθορίζει την πρόσβαση ή την απαγόρευση εισόδου ενός μορίου εντός του καναλιού και συνεπώς εντός του κυττάρου. Τα κανάλια επίσης έχουν τη δυνατότητα να ξεχωρίζουν και να επλέγουν το μέγεθος και το φορτίο του διερχόμενου, εντός του καναλιού, μορίου και η ιδιότητά τους αυτή χαρακτηρίζεται ως εκλεκτικότητα ιόντων⁸.

Οι μεμβρανικοί υποδοχείς είναι εξειδικευμένες πρωτεΐνες στις μεμβράνες των κυττάρων όπου και συνδέονται με εξωτερικά μόρια, όπως ορμόνες, και νευροδιαβιβαστές, και έτσι ενεργοποιούν μεταβολές στη λειτουργία του κυττάρου.

Ουσιαστικά, οι υποδοχείς δέχονται εξωτερικά χημικά σήματα και τα διαβιβάζουν στο εσωτερικό των κυττάρων. Στα κύτταρα, υπάρχει πληθώρα διαφορετικών υποδοχέων με διακριτές λειτουργίες όπως είναι οι συζευγμένοι με πρωτεΐνες υποδοχείς (GPCRs), οι οσφρητικοί υποδοχείς (ORs) κ.α. ²



Σχήμα 1: Σχηματική αναπαράσταση της δομής του κυτταρικού φακέλου του βακτηρίου *Escherichia coli*.

1.2 Η σημασία των μεμβρανοπρωτεϊνών για τη φαρμακευτική βιομηχανία

Η σωστή λειτουργία διαφόρων μεμβρανικών πρωτεϊνών αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την υγεία του ανθρώπου καθώς οι πρωτεΐνες αυτές εμπλέκονται σε πολλές και σοβαρές ασθένειες όπως ο διαβήτης, η κυστική ίνωση, η επιληψία, η υπέρταση και ο καρκίνος^{9, 10}. Στην υπεροικογένεια των μεμβρανοπρωτεϊνών, οι GPCRs αποτελούν περίπου το 3% του ανθρώπινου πρωτεώματος, καθιστώντας αυτή την κατηγορία πρωτεϊνών ως την πλέον σημαντική από φαρμακευτικής πλευράς. Συγκεκριμένα, οι GPCRs αποτελούν το ~50% των φαρμακευτικών στόχων¹⁰⁻¹² καθώς η βασική τους λειτουργία είναι η μετατροπή ενός ποικίλου εύρους εξωκυττάριων ερεθισμάτων, όπως είναι οι ορμόνες, οι νευροδιαβιβαστές κ.α., σε σήματα εντός του κυττάρου, ρυθμίζοντας ένα τεράστιο αριθμό φυσιολογικών διεργασιών όπως είναι ο κυτταρικός μεταβολισμός, η ανάπτυξη, η νευροδιαβίβαση κ.α.¹³. Το 20% των κορυφαίων 50 φαρμάκων σε πωλήσεις διεθνώς στοχεύουν σε GPCRs, ευρέως γνωστά παραδείγματα των οποίων αποτελούν το Claritin, το Zyprexa, το Zantac και το Cozaar¹⁴ (Σχήμα 2).



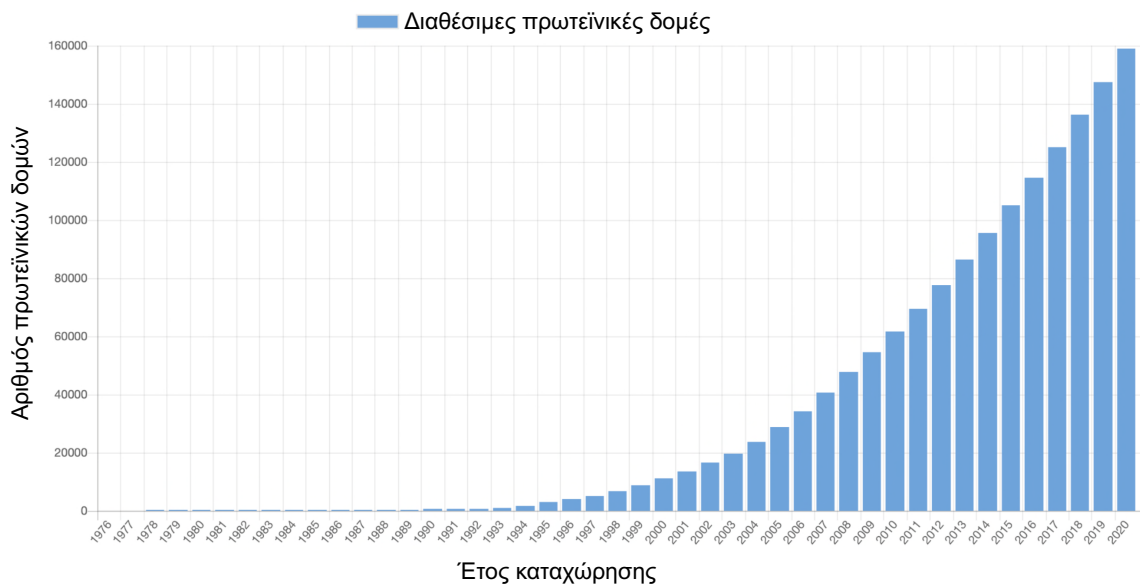
Σχήμα 2 : Σχηματική αναπαράσταση του ποσοστού των φαρμάκων που στοχεύουν σε GPCRs στην παγκόσμια αγορά.

Προσαρμοσμένο σχήμα από Ma et al.¹⁴

Όπως γίνεται αντιληπτό, η ανάγκη γνώσης της τρισδιάστατης δομής και κατ' επέκταση της λειτουργίας των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών είναι τεράστια, καθώς μόνο με αυτόν τον τρόπο η επιστημονική κοινότητα μπορεί να κατανοήσει σε μοριακό επίπεδο ποικίλες κοινές παθολογίες και να προβεί στην ανάπτυξη νέων βελτιωμένων και πιο αποτελεσματικών φαρμακευτικών σκευασμάτων για την αντιμετώπισή τους.

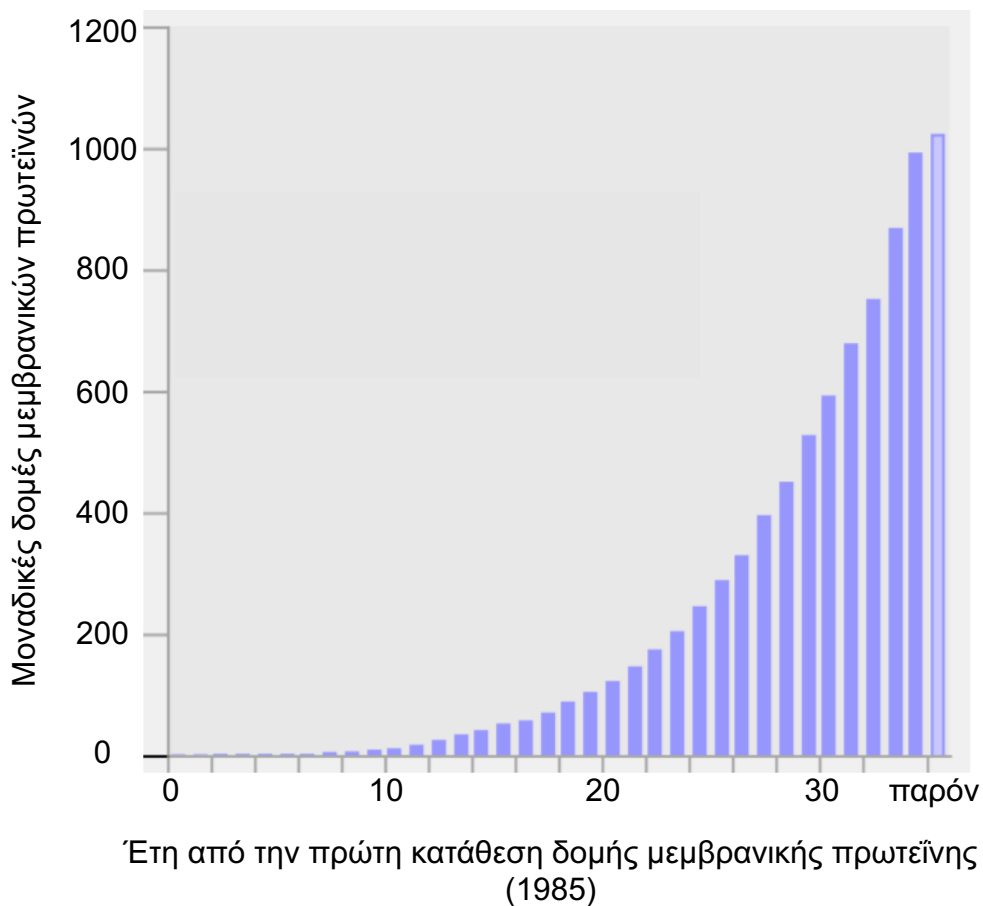
1.3 Προκλήσεις που σχετίζονται με τη δομική ανάλυση των μεμβρανοπρωτεϊνών

Παρά τη μεγάλη λειτουργική σημασία των μεμβρανοπρωτεϊνών, η διαθέσιμη γνώση της δομικής βιολογίας των μεμβρανοπρωτεϊνών είναι ελάχιστη σε σχέση με αυτή που αντιστοιχεί στις υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα, από τις 162.269 δομές που έχουν καταχωρηθεί μέχρι σήμερα στη βάση δεδομένων πρωτεϊνικών δομών (PDB) (στατιστικά δεδομένα μέχρι και τον Απρίλιο 2020) (Σχήμα 3), μόνο ένα μικρό ποσοστό, λιγότερο από 1%, αντιστοιχεί σε διαμεμβρανικές πρωτεΐνες¹⁵ (Σχήμα 4). Μέχρι σήμερα, έχουν καταχωρηθεί μόνο 1.023 μοναδικές δομές διαμεμβρανικών πρωτεϊνών (<https://blanco.biomol.uci.edu/mpstruc/>).



Σχήμα 3: Διάγραμμα κατανομής ανά έτος των κατατεθειμένων δομών στη βάση δεδομένων πρωτεϊνικών δομών (PDB) μέχρι και τον Απρίλιο του 2020.

Προσαρμοσμένο σχήμα από Bank et al.¹⁶



Σχήμα 4: Διάγραμμα κατανομής (από το έτος 1985 που κατατέθηκε η πρώτη δομή διαμεμβρανικής πρωτεΐνης) των κατατεθειμένων μοναδικών δομών μεμβρανοπρωτεϊνών στη βάση δεδομένων μέχρι και τον Απρίλιο του 2020.

Προσαρμοσμένο σχήμα από (<https://blanco.biomol.uci.edu/mpstruc/>).

Υπάρχουν τρεις βασικές προκλήσεις/περιορισμοί που σχετίζονται με τη δομική ανάλυση μεμβρανοπρωτεϊνών: Πρώτον, η απόκτηση επαρκών ποσοτήτων απομονωμένης πρωτεΐνης υψηλής ποιότητας είναι συνήθως πολύ δύσκολη. Η ποσότητα διαμεμβρανικών πρωτεϊνών που παράγεται εγγενώς σε ένα κύτταρο είναι κατά κανόνα ελάχιστη, οπότε και η απομόνωση ποσότητας πρωτεΐνης από τους φυσικούς ιστούς, ποσοτικά και ποιοτικά κατάλληλης για δομικές και λειτουργικές μελέτες, είναι εξαιρετικά δύσκολη. Επίσης, ακόμα κι αν η απομόνωση ικανής

ποσότητας πρωτεΐνης από φυσικούς ιστούς επιτευχθεί, αυτομάτως αυτή αποτελεί μία πρωτεΐνη η οποία δε χαρακτηρίζεται από βελτιωμένες ιδιότητες ως προς τη διαχείρισή της, τη σταθερότητα και την απομόνωσή της¹⁷. Δεύτερον, ο βαθμός δυσκολίας τόσο στην ετερόλογη έκφραση, όσο και στις διαδικασίες απομόνωσης της παραγόμενης πρωτεΐνης είναι πολύ μεγάλος. Τέλος, η χρήση τεχνικών προσδιορισμού τρισδιάστατων πρωτεϊνικών δομών, όπως η κρυσταλλογραφία ακτινών Χ και η cryo-EM, προϋποθέτει υψηλής ποιότητας πρωτεΐνες, οι οποίες να πληρούν συγκεκριμένα κριτήρια. Πιο συγκεκριμένα, προκειμένου να μπορέσει να μελετηθεί η δομή μίας πρωτεΐνης, η δημιουργία κρυστάλλων είναι απαραίτητη στις περισσότερες περιπτώσεις, με εξαίρεση την τεχνική cryo-EM, καθώς και τη μικροσκοπία μονού σωματιδίου (single particle electron microscopy).^{18, 19} Η απόκτηση κρυστάλλων διαμεμβρανικών πρωτεϊνών παραμένει ακόμα μία μεγάλη πρόκληση, καθώς ακόμα κι αν επιτευχθεί η απόκτηση αρκετής ποσότητας καθαρής πρωτεΐνης, σε μορφή μη συσσωματωμένη και κατάλληλη για δομική και λειτουργική ανάλυση, η ύπαρξη συνήθως μεγάλων μικυλλίων, εξαιτίας της χρήσης απορρυπαντικών κατά την εξαγωγή από τη μεμβράνη, σε συνδυασμό με τη μη σταθερότητα των πρωτεϊνών στο διάλυμα όπου βρίσκονται, δυσχαιρένει περαιτέρω τον σχηματισμό επαρκών κρυσταλλικών επαφών, οι οποίες και απαιτούνται για τον τελικό σχηματισμό πρωτεϊνικών κρυστάλλων. Νέες προσεγγίσεις και πρωτόκολλα διαχείρισης των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών έχουν προταθεί τα τελευταία χρόνια, παρεμβαίνοντας και βελτιώνοντας τόσο τη σταθερότητα των παραγόμενων πρωτεϊνών^{20, 21}, όσο και την ποιότητα του τελικού προϊόντος προς ανάλυση²².

1.4 Υπερέκφραση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών

Δεδομένου ότι εγγενώς οι μεμβρανοπρωτεΐνες παράγονται σε πολύ χαμηλές ποσότητες, η απόκτησή τους σε υψηλές ποσότητες για βιοχημικές και δομικές αναλύσεις πραγματοποιείται συνήθως με τη χρήση ομόλογων ή ετερόλογων οργανισμών.

Πολλά διαφορετικά συστήματα έκφρασης έχουν αναπτυχθεί για την επιτυχή παραγωγή διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, κυρίως ανθρωπίνων. Κάθε σύστημα χαρακτηρίζεται από τα δικά του πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Μέχρι σήμερα, τα πλέον χρησιμοποιούμενα και επιτυχή συστήματα ετερόλογης παραγωγής είναι το βακτήριο (*Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*), η ζύμη (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*), ο βακουλοϊός (*Baculovirus*), το ψάρι ζέβρα (*Zebrafish*), τα κύτταρα εντόμων (*Spodoptera fugiperda Sf9*, *Sf21*, *Trichoplusia ni High Five*, *Drosophila Schneider S2*), καθώς και τα κύτταρα θηλαστικών (CHO, HEK, COS-1)²³. Εκτός αυτών, κι άλλα συστήματα έχουν χρησιμοποιηθεί όπως είναι η cell-free πρωτεϊνική σύνθεση όπου η παραγωγή πρωτεϊνών πραγματοποιείται σε ανοιχτά συστήματα χρησιμοποιώντας κυτταρικά συστατικά από διαφορετικούς οργανισμούς, όπως έντομα, λαγούς, βακτήρια και άλλα, αντί κυττάρων. Ένα άλλο σύστημα που έχει αναφερθεί είναι αυτό χρήσης ολόκληρων οργανισμών όπως μυγών, βατράχων και μεταξοσκωλήκων. Ενδεικτικά αναλύονται παρακάτω κάποια από τα πιο συνήθη συστήματα ετερόλογης παραγωγής διαμεμβρανικών πρωτεϊνών.

Το θετικό κατά Gram βακτήριο *Lactococcus lactis* έχει χρησιμοποιηθεί αρκετά για την ετερόλογη παραγωγή διαμεμβρανικών πρωτεϊνών^{24, 25}. Το βακτήριο αυτό έχει λιγότερες πρωτεάσες συγκριτικά με το *E. coli* καθώς επίσης διαθέτει μια

πολύ πιο απλή δομικά μεμβράνη, χαρακτηριστικό που βοηθά την απομόνωση της παραγόμενης πρωτεΐνης^{26, 27}. Το 2005, η ομάδα του Kiongji κατάφερε να εκφράσει με επιτυχία 11 μιτοχονδριακές μεμβρανικές πρωτεΐνες στο βακτήριο αυτό. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά, το ποσοστό της επιτυχούς έκφρασης ευκαρυωτικών διαμεμβρανικών πρωτεϊνών ήταν υψηλό (10-30%), αν κι έχει αποδειχθεί πως κατά τη διαδικασία της έκφρασης προκαλείται στο βακτήριο αντίδραση σοβαρού στρες που εικάζεται πως συνδέεται με τη συσσώρευση μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών²⁸.

Η ζύμη *S. cerevisiae* είναι ένας απλός ευκαρυωτικός οργανισμός ο οποίος μπορεί και πραγματοποιεί μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως είναι η γλυκοζυλίωση και ο σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών στην παραγόμενη πρωτεΐνη²⁹. Όμως, εξαιτίας της τόσο διαφορετικής λιπιδικής σύστασης του οργανισμού αυτού συγκριτικά με αυτής των κυττάρων των θηλαστικών, επηρεάζεται συχνά σε μεγάλο βαθμό η ενεργότητα, η σωστή αναδίπλωση και η σταθερότητα των πρωτεϊνών που παράγονται³⁰.

Η παραγωγή διαμεμβρανικών πρωτεϊνών ευκαρυωτικής προελεύσεως σε κύτταρα θηλαστικών και εντόμων χαρακτηρίζεται από αρκετά πλεονεκτήματα όπως είναι το λιπιδικό περιβάλλον, οι μηχανισμοί εκκρίσεως και οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις³¹. Όμως, η χρήση αυτού του συστήματος είναι αρκετά ακριβή, ειδικά όταν η πρωτεΐνη προορίζεται για δομικές μελέτες, και δύσκολη, όσον αφορά στη διαδικασία που απαιτείται προκειμένου να παραχθεί μία καλής ποιότητας πρωτεΐνη³². Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί πως η υπερέκφραση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών σε υψηλά επίπεδα μπορεί να επιφέρει ημιτελή γλυκοζυλίωση³³.

Στην περίπτωση επιλογής χρήσης κυττάρων εντόμων, συναντάται ένα ασφαλές ωγενές σύστημα έκφρασης μέσω του βακουλοϊού (Baculovirus Expression Vector

System, BEVS). Συγκεκριμένα αυτή η προσέγγιση στηρίζεται στη μόλυνση κυτταρικών σειρών εντόμων μέσω ανασυνδυασμένων ιών που φέρουν το γονίδιο (όσο μεγάλο μέγεθος κι αν έχει) που κωδικοποιεί για την παραγωγή της επιθυμητής μεμβρανικής πρωτεΐνης, χωρίς ο ιός να ενσωματώνεται εντός του γονιδιώματος των κυττάρων των εντόμων που προσβάλει³⁴. Με την ανακάλυψη του BEVS το 1983 και τις συνεχείς του βελτιώσεις (μέχρι σήμερα έχουν τροποποιηθεί κατάλληλα και χρησιμοποιούνται παραπάνω από 400 κυτταρικές σειρές³⁵), έχει επιτευχθεί η παραγωγή αρκετών GPCRs, καθώς και τμήματα αυτών, όπως του β2 αδρενεργικού υποδοχέος³⁶ και της ακουαπορίνης AQP4³⁷. Το συγκεκριμένο σύστημα θεωρείται ένα από τα πλέον εύχρηστα και επιτυχή ευκαρυωτικά συστήματα παραγωγής διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, καθώς μπορεί να αποδόσει εύκολα μεγάλες ποσότητες βιολογικά ενεργής πρωτεΐνης, και να χρησιμοποιηθεί και σε μεγάλης κλίμακας παραγωγικές διαδικασίες όπως είναι ο βιοαντιδραστήρας^{38, 39}.

Στη cell-free πρωτεϊνική σύνθεση, το περιβάλλον όπου πραγματοποιείται η σύνθεση των πρωτεϊνών είναι ελεγχόμενο, χωρίς να χαρακτηρίζεται από τις ανάγκες και την υψηλή ευαισθησία του ζωντανού κυττάρου. Όντως, κάθε πιθανός συνδυασμός που απαιτείται προκειμένου να εξασφαλιστεί η σταθερότητα και η σωστή αναδίπλωση της νέας πρωτεΐνης, όπως είναι οι αναστολές πρωτεασών, συμπαράγοντες και άλλες ουσίες, μπορούν να προστεθούν άμεσα στο ανοικτό αυτό σύστημα. Επιπλέον, οι μεμβρανικές πρωτεΐνες που παράγονται μπορούν να ενσωματωθούν αμέσως σε λιποσώματα που έχουν προστεθεί στο σύστημα αυτό⁴⁰. Τα λιποσώματα αυτά προέρχονται από φωσφολιπίδια και μπορούν να είναι δύο ειδών: στο ένα είδος χρησιμοποιείται κάποιο επιφανειοενεργό κατά την προετοιμασία του, ενώ στο άλλο είδος όχι. Η επιλογή για το κατάλληλο είδος λιποσώματος γίνεται κάθε

φορά με γνώμονα το είδος της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης που πρόκειται να παραχθεί και επιπλέον, των διεργασιών που έπονται της παραγωγής της (πχ μέτρηση ενεργότητας κτλ.). Παρά τα πολυάριθμα πλεονεκτήματα των προαναφερθέντων διαφορετικών συστημάτων παραγωγής, η χρήση τους παραμένει σε πολλές περιπτώσεις πολύπλοκη και αρκετά ακριβή, και δεν ενδείκνυται ακόμα για μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες (χρησιμοποιώντας για παράδειγμα βιοαντιδραστήρες) όπου θα παραγόταν και ικανοποιητική ποσότητα πρωτεΐνης.

Κεφάλαιο 2 - Το βακτήριο *Escherichia coli* ως σύστημα υπερέκφρασης διαμεμβρανικών πρωτεϊνών

2.1 Χαρακτηριστικά του *Escherichia coli*

Το *Escherichia coli* είναι ένα κατά Gram αρνητικό, δυνητικώς αναερόβιο, βακτήριο το οποίο ανακαλύφθηκε το 1885 στο ανθρώπινο κόλον από τον Γερμανό βακτηριολόγο Theodor Escherich⁴¹. Το *E. coli* αποτελεί τον πλέον καλά χαρακτηρισμένο οργανισμό, βασικότατο εργαλείο στα εργαστήρια μοριακής βιολογίας, καθώς και στη βιομηχανία. Βασικά πλεονεκτήματα όπως η ταχύτατη ανάπτυξη, οι εύκολες συνθήκες καλλιέργειας, η γνώση για τον μεταβολισμό και τη φυσιολογία και η πληθώρα των διαθέσιμων εργαλείων για τη γενετική τροποποίηση αυτού του βακτηρίου, τον έχουν καταστήσει έναν από τους καλύτερους οργανισμούς για μεταβολική μηχανική και συνθετική βιολογία. Επιπλέον, σημαντικό προνόμιο αποτελεί το γεγονός πως το γονιδίωμα πολλών στελεχών είναι πλέον γνωστό, καθιστώντας έτσι το χειρισμό τους ακόμα πιο εύκολο^{42, 43}. Μέχρι σήμερα, υπάρχουν 484 στελέχη *E. coli* τα οποία έχουν πλήρως αλληλουχηθεί (NCBI, 2018).

Το *E. coli* έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την ετερόλογη έκφραση πολλών πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων και διαμεμβρανικών^{17, 44}. Συγκεκριμένα, περίπου το 20% όλων των γνωστών δομών διαμεμβρανικών πρωτεϊνών που έχουν κατατεθεί στη βάση δεδομένων PDB έχουν προέλθει από πρωτεΐνες που έχουν παραχθεί στο *E. coli*⁴⁵.

2.2 Βιογένεση και αναδίπλωση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών στα βακτήρια

Όπως είναι γνωστό, όλες οι πρωτεΐνες συντίθενται στο κυτταρόπλασμα. Η επιφάνεια των υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών είναι εμπλουτισμένη σε πολικά και φορτισμένα αμινοξέα, ενώ οι υδρόφοβες περιοχές βρίσκονται εντός της πρωτεΐνης, προστατευμένες από το υδατικό περιβάλλον⁴⁶. Αντιθέτως, οι πρωτεΐνες οι οποίες διαπερνούν τη μεμβράνη, είτε την εσωτερική είτε την εξωτερική, χαρακτηρίζονται από υδρόφοβα αμινοξέα τα οποία βρίσκονται στην επιφάνεια της πρωτεΐνης προκειμένου να αλληλοεπιδράσουν με το λιπιδικό περιβάλλον⁵. Αφού συντεθεί η πολυπεπτιδική αλυσίδα, το μονοπάτι που θα ακολουθήσει για να ολοκληρωθεί η διαδικασία και να δημιουργηθεί μία σωστά αναδιπλωμένη και λειτουργική πρωτεΐνη, εξαρτάται πλήρως από τον τελικό προορισμό της. Οι πρωτεΐνες οι οποίες πρόκειται να ενσωματωθούν σε οποιοδήποτε από τα 3 μέρη της κυτταρικής μεμβράνης φέρουν στο αμινοτελικό τους άκρο συγκεκριμένες σηματοδοτικές αλληλουχίες, οι οποίες και ορίζουν την πορεία και την ενσωμάτωση των πρωτεϊνών αυτών.

Η αναδίπλωση των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών είναι μία περίπλοκη διαδικασία κατά την οποία η πρωτεΐνη μπορεί να οδηγηθεί σε ποικίλες μη λειτουργικές διαμορφώσεις⁴⁷. Στη περίπτωση των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, η φυσιολογική τους τοπολογία⁵ τις καθιστά εξαιρετικά επιρρεπείς στη συσσώματωση. Για να αποφευχθεί το φαινόμενο αυτό, οι οργανισμοί είναι εξοπλισμένοι με μοριακούς συνοδούς και άλλα μόρια, όπως λιπίδια και μόρια RNA^{48, 49}, τα οποία και συνδέονται με τη νεοσύστατη πρωτεΐνη, και τη βοηθούν να αναδιπλωθεί σωστά και

να οδηγηθεί με ασφάλεια στον προορισμό της⁴⁸. Μερικές μοριακές συνοδοί επιταχύνουν την αναδίπλωση των πρωτεϊνών, ενώ κάποιες άλλες εμποδίζουν την πρόωρη αναδίπλωση τους. Επίσης, υπάρχουν μοριακές συνοδοί που είναι προσδεμένοι πάνω στο ριβόσωμα και έτσι αλληλοεπιδρούν με την πολυπεπτιδική αλυσίδα κατά την έξοδό της, δηλαδή με ένα συν-μεταφραστικό τρόπο, ενώ άλλοι μοριακοί συνοδοί δρουν μετα-μεταφραστικά. Η σημασία των μοριακών συνοδών στην εύρυθμη λειτουργία ενός οργανισμού είναι τεράστια, καθώς η έλλειψή τους οδηγεί σε εκτεταμένη δημιουργία πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων, μη σωστή αναδίπλωση σημαντικών πρωτεϊνών και μη αποδόμηση και απομάκρυνση προβληματικών πρωτεϊνών. Στο *E. coli* συναντώνται 3 βασικά συστήματα μοριακών συνοδών: το σύστημα DnaK/DnaJ/GrpE, το σύστημα GroEL/ES και η πρωτεΐνη Trigger Factor. Τα 3 αυτά συστήματα συνεργάζονται μεταξύ τους, διαμορφώνοντας ένα δίκτυο, το οποίο, όπως έγινε προσφάτως γνωστό, μετέχει και στο μονοπάτι βιογένεσης κάποιων πρωτεϊνών του κυτταρικού φακέλου^{50, 51}.

Στο *E. coli* υπάρχουν τρεις μηχανισμοί για τη μεταφορά πρωτεϊνών διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης: το μονοπάτι Sec (secretory pathway), το μονοπάτι SRP (signal recognition particle pathway) και το μονοπάτι Tat (twin-arginine translocation pathway). Μέσω του μονοπατιού SRP πραγματοποιείται συμμεταφραστική πρωτεϊνική μεταφορά, μέσω του Tat μετα-μεταφραστική, ενώ μέσω του Sec είτε συν- είτε μετα-μεταφραστική μεταφορά, ανάλογα με τις ιδιότητες της προς μεταφορά πρωτεΐνης^{6, 52, 53}. Στα βακτήρια, το τρανολοκόνιο Sec αποτελεί το σύμπλοκο SecYEG⁵⁴. Εν αντιθέσει με τις περισσότερες πρωτεΐνες που εκκρίνονται από την κυτταροπλασματική μεμβράνη, οι οποίες ακολουθούν τη μετα-μεταφραστική στόχευση⁵⁵, οι μεμβρανικές πρωτεΐνες δε μπορούν να παραχθούν στο

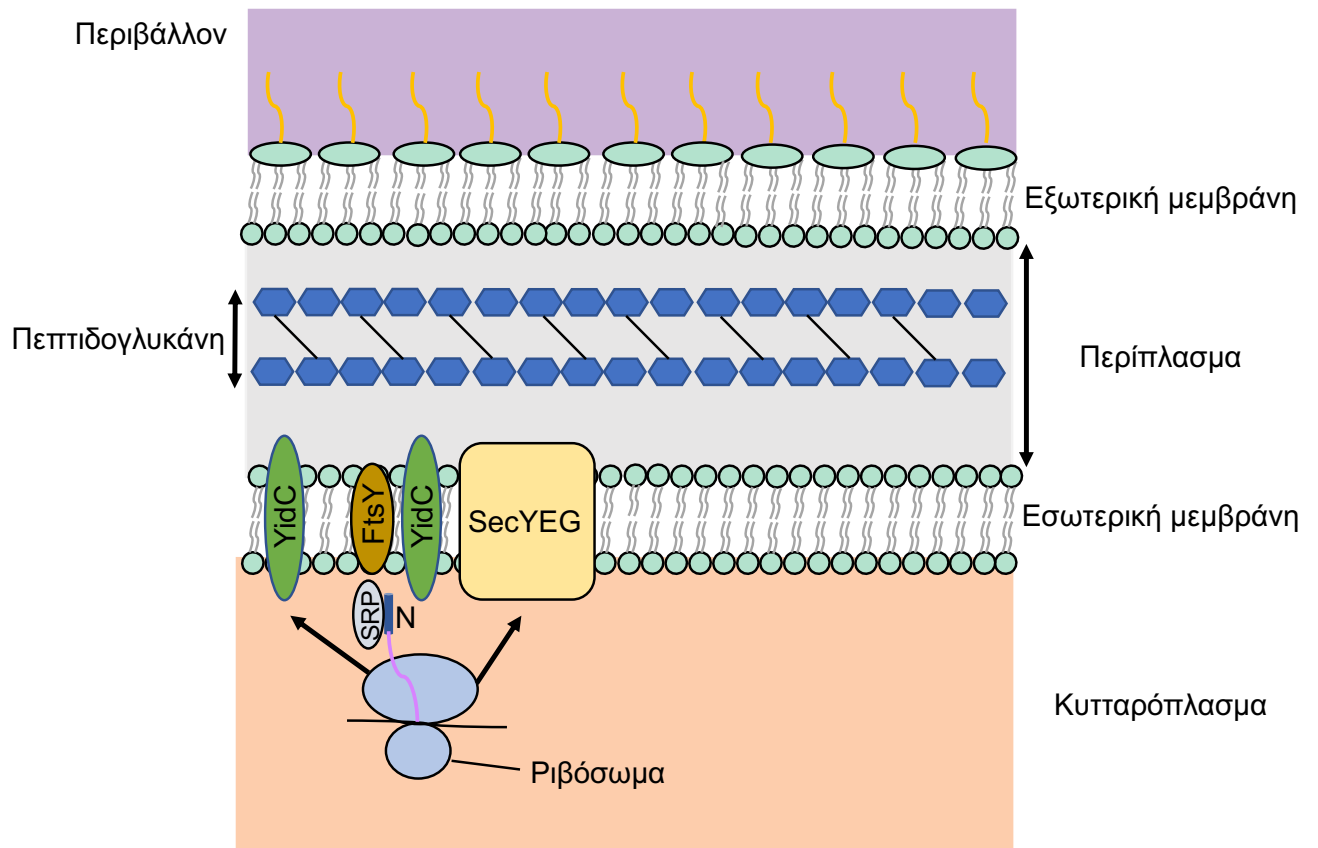
κυτταρόπλασμα λόγω της υδρόφοβης φύσης τους με αποτέλεσμα να ακολουθούν τη συν-μεταφραστική στόχευση.

Οι πρωτεΐνες που εδράζονται στον κυτταρικό φάκελο πρέπει να οδηγηθούν από το κυτταρόπλασμα, όπου και συντίθενται, στον τελικό τους προορισμό. Η βιογένεση των περισσότερων διαμεμβρανικών πρωτεϊνών πραγματοποιείται από ριβοσώματα τα οποία βρίσκονται συνδεδεμένα με τη μεμβράνη⁵⁶. Ο καθορισμός για το ποια πρωτεΐνη θα σταλεί πού, γίνεται με βάση μία αλληλουχία-σήμα στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης, η οποία αλληλουχία αποκόπτεται στην περίπτωση των εκκρινόμενων πρωτεϊνών ή των πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης⁵⁷.

Οι πολυτοπικές μεμβρανικές πρωτεΐνες ενσωματώνονται στη μεμβράνη με συν-μεταφραστική στόχευση, μέσω του σωματιδίου αναγνώρισης σήματος (SRP)⁵⁸. Το SRP αναγνωρίζει την αλληλουχία-σήμα που φέρει η εκάστοτε νεοσύστατη πρωτεΐνη, όταν αυτή εξέρχεται του ριβοσώματος, και τελικά την οδηγεί στο τρανσλοκόνιο Sec. Πιστεύεται πως η αναγνώριση από το SRP βασίζεται στο ότι η αλληλουχία-σήμα είναι εξαιρετικά υδρόφοβη⁵⁹. Σε συνδυασμό με τον υποδοχέα του, FtsY, συντονίζει την παράδοση των νεοσυστατών πρωτεϊνών στο τρανσλοκόνιο Sec. Η πρόσδεση του SRP στον υποδοχέα FtsY συνδέεται με την υδρόλυση του GTP^{60, 61} : κατά την άφιξη της νεοσυστατής πρωτεΐνης στη μεμβράνη, η υδρόλυση του GTP προκαλεί αλλαγές στη διαμόρφωση του SRP και του FtsY και έτσι αυτά αποσυνδέονται, δίνοντας έτσι την ευκαιρία στο ριβόσωμα να συνεχίσει τη μετάφραση. Ταυτοχρόνως η πρωτεΐνη ενσωματώνεται στο τρανσλοκόνιο SEC, δημιουργώντας το πρώτο διαμεμβρανικό τμήμα της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης. Η διαδικασία αυτή συνεχίζεται μέχρις ότου να ενσωματωθεί όλη η πρωτεΐνη εντός της μεμβράνης. Η YidC είναι μία πρωτεΐνη η οποία είναι επίσης ιδιαίτερος σημαντική

κατά τη διαδικασία της ενσωμάτωσης νέων πρωτεϊνών στη μεμβράνη, δρώντας είτε σε συνεργασία με το τρανσλοκόνιο Sec, είτε ανεξάρτητα⁶² (Σχήμα 5).

Η σωστή τοπολογία μίας πρωτεΐνης είναι απαραίτητη για την εύρυθμη λειτουργία της. Ένα διαμεμβρανικό τμήμα έχει δύο πιθανές κατευθύνσεις όταν ενσωματώνεται στη μεμβράνη: είτε το αμινο-τελικό του άκρο να βρεθεί στο κυτταρόπλασμα με το καρβοξυτελικό άκρο να είναι στο περίπλασμα, είτε το ανάποδο. Η κατεύθυνση που θα έχει τελικά ορίζεται βάση του μήκους, της κατανομής των φορτισμένων αμινοξέων, της υδροφοβικότητάς του και της λιπιδικής σύνθεσης της μεμβράνης όπου ενσωματώνεται⁶³. Τα θετικώς φορτισμένα τμήματα συνήθως εντοπίζονται στην κυτταροπλασματική πλευρά της μεμβράνης (positive inside rule). Μία πιθανή εξήγηση γι αυτό το φαινόμενο αποτελεί το γεγονός πως τα δίπολα, τα οποία σχηματίζονται και βρίσκονται συνδεδεμένα με τα λιπίδια, καθιστούν τη μεμβράνη πιο διαπερατή από ανιόντα, παρά από κατιόντα⁶⁴. Η κατεύθυνση που θα πάρει το πρώτο διαμεμβρανικό τμήμα μίας πρωτεΐνης, συνήθως ορίζει και την τοπολογία των επόμενων διαμεμβρανικών τμημάτων που την ακολουθούν, χωρίς αυτό να σημαίνει πως δεν υπάρχει η πιθανότητα να επέλθουν αλλαγές στην πορεία⁶⁵.



Σχήμα 5: Παραλαβή και ενσωμάτωση νέων πρωτεϊνών με συν-μεταφραστικό τρόπο στο βακτήριο *Escherichia coli*.

Το SRP αναγνωρίζει την αλληλουχία-σήμα στο αμινοτελικό άκρο της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, και το σύμπλοκο, είτε μεταφέρεται στο SecYEG με τη βοήθεια του FtsY, υποδοχέα του SRP, είτε μεταφέρεται κατευθείαν στην πρωτεΐνη YidC .

2.3 Το πρόβλημα της κυτταροτοξικότητας

Το βακτήριο *E. coli*, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, χρησιμοποιείται ευρέως ως οργανισμός υπερπαραγωγής πρωτεϊνών, καθώς χαρακτηρίζεται από πληθώρα πλεονεκτημάτων. Παρόλα αυτά, η παραγωγή διαμεμβρανικών πρωτεϊνών μέσω του συγκεκριμένου οργανισμού έχει συχνά ως αποτέλεσμα τη σοβαρή τοξικότητα για τον οργανισμό και τη χαμηλή κυτταρική παραγωγικότητα. Η τοξικότητα αυτή οδηγεί τις περισσότερες φορές, ειδικά κατά την υπερπαραγωγή ευκαρυωτικών πρωτεϊνών, σε πλήρη παύση του βακτηριακού πολλαπλασιασμού και κατά συνέπεια σε σημαντικότερη μείωση της τελικής βιομάζας, άρα και της παραγόμενης πρωτεΐνης σε ογκομετρική απόδοση^{17, 66-69}. Τα αίτια αυτού του φαινομένου δεν είναι ακόμα γνωστά αλλά υπάρχουν αρκετές εικασίες. Μία υπόθεση αποτελεί η άποψη πως ίσως η τοξικότητα αυτή οφείλεται στις βιοχημικές ιδιότητες των, υπό παραγωγή, διαμεμβρανικών πρωτεϊνών^{68, 70}. Άλλη πιθανή εξήγηση αποτελεί η κατάρρευση του μηχανισμού της ενσωμάτωσης των νεοσυστατών πρωτεϊνών στη μεμβράνη μέσω του τρανσλοκονίου Sec, η οποία ίσως συνδέεται με ανεπάρκεια της ενέργειας που απαιτείται, με δυσλειτουργία του μηχανισμού της αναπνοής του κυττάρου, και μειωμένη λειτουργικότητα του κυτταρικού φακέλου και της κυτταρικής διαίρεσης, καθώς επίσης και με τη δημιουργία πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων^{66, 71, 72}. Επίσης, η κατάρρευση του μηχανισμού βιοσύνθεσης, ως αποτέλεσμα του αυξημένου μεταγραφικού ρυθμού των γονιδίων⁷¹ και της αυξημένης χρήσης των ριβοσωμάτων⁷³, αποτελεί μία επιπλέον πιθανή εξήγηση.

2.4. Τα υπάρχοντα στελέχη *E. coli*

Στην προσπάθεια να υπερπαραχθούν αποτελεσματικά μεμβρανικές πρωτεΐνες στον οργανισμό *E. coli*, ποικίλες προσεγγίσεις έχουν ακολουθηθεί, οι οποίες περιλαμβάνουν και τροποποίηση του ίδιου του οργανισμού *E. coli*. Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω ποικίλων τρόπων, κάποιιοι εκ των οποίων είναι η χημική μεταλλαξιγένεση ή η μεταλλαξιγένεση μέσω τρανσποζονίων σε γονίδια του *E. coli*^{74, 75}. Επιπροσθέτως, άλλες προσεγγίσεις που έχουν χρησιμοποιηθεί αποτελούν η τροποποίηση του μονοπατιού βιοσύνθεσης των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, η συμπαραγωγή άλλων *E. coli* πρωτεϊνών⁷⁶, η κατασκευή χημικών κατασκευών της μεμβρανικής πρωτεΐνης με κάποια άλλη που παράγεται αποδεδειγμένα εύκολα και τη «συμπαρασύρει» σε σωστή αναδίπλωση⁷⁷, η τροποποίηση της δράσης των μοριακών συνοδών⁷⁸, η μείωση του ρυθμού πρόσληψης ποικίλων σημαντικών θρεπτικών συστατικών (π.χ. του μονοσακχαρίτη της γλυκόζης) από τον οργανισμό *E. coli*⁷⁹, η ρύθμιση της δράσης της T7 RNA πολυμεράσης (RNAP) από την T7 λυσοζύμη^{71, 80} κ.α.. Παρόλα αυτά, οι προσεγγίσεις που περιλαμβάνουν τροποποίηση του φορέα έκφρασης είναι αρκετά απαιτητικές εξαιτίας της πολυπλοκότητας που χαρακτηρίζει τη διαδικασία βιοσύνθεσης διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, όπου απαιτείται πλήρης συντονισμός και ακρίβεια για να ολοκληρωθεί επιτυχώς η σύνθεση, αναδίπλωση και τελικώς η εισαγωγή της εκάστοτε πρωτεΐνης εντός της μεμβράνης.

Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα βακτηριακά στελέχη για την επιτυχή υπερπαραγωγή διαμεμβρανικών πρωτεϊνών είναι αυτά που έχουν προκύψει από το στέλεχος BL21(DE3), το οποίο στερείται τις πρωτεάσες Lon και OmpT, με τα πλέον γνωστά να είναι τα στελέχη C41(DE3) και C43(DE3)⁶⁷. Στο στέλεχος BL21(DE3) η

επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου που κωδικοποιεί για την παραγωγή της εκάστοτε πρωτεΐνης είναι υπό τον έλεγχο της RNA πολυμεράσης του βακτηριοφάγου T7 (T7 RNAP). Η T7 RNAP αναγνωρίζει συγκεκριμένα τον T7 υποκινητή και μεταγράφει πολύ πιο γρήγορα από την ενδογενή *E. coli* RNAP^{81, 82}. Η έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί για την T7 RNAP πραγματοποιείται επάγοντας τον υποκινητή *lacUV5* μετά από προσθήκη isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)⁸³. Η χρήση του συγκεκριμένου στελέχους βασίζεται στη συλλογιστική πως η περισσότερη παραγωγή mRNA συνεπάγεται και παραπάνω ποσότητα τελικής πρωτεΐνης, γεγονός που απεδείχθη πως, στη περίπτωση των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, δε μπορεί να εφαρμοστεί καθώς έχει παρατηρηθεί πως υπήρχαν σοβαρά προβλήματα στη λειτουργία και την αναδίπλωση των πρωτεϊνών, και πως η υπερφόρτωση του μηχανισμού βιοσύνθεσης, οδηγεί τελικά σε κατάρρευση⁶⁶.

Με τη χρήση του στελέχους BL21(DE3) για την υπερπαραγωγή τοξικών πρωτεϊνών, οι Miroux και Walker κατάφεραν να απομονώσουν δύο νέα στελέχη, τα C41(DE3) και C43(DE3). Τα εν λόγω στελέχη, βρέθηκαν ικανά να ανθίστανται στην τοξικότητα και να παράγουν επιτυχώς την επιθυμητή πρωτεΐνη⁶⁷. Πολλά χρόνια αργότερα, βρέθηκε πως οι βελτιωμένες ιδιότητες των στελεχών αυτών οφείλονταν σε μεταλλάξεις που βρίσκονταν στον υποκινητή *lacUV5*, καθιστώντας τον πιο αδύναμο, άρα τα επίπεδα έκφρασης ήταν μειωμένα, και συνεπώς, η ολική μεταγραφική ικανότητα της T7 RNA πολυμεράσης, με αποτέλεσμα να παράγεται λιγότερο mRNA που αντιστοιχεί στην υπό παραγωγή πρωτεΐνη. Τα αποτελέσματα της χρήσης των στελεχών αυτών υπέδειξαν πως υπάρχει ένα ανώτατο όριο στα επίπεδα του mRNA της παραγόμενης πρωτεΐνης που μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένα επίπεδα

παραγωγής διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, και πέραν αυτού, διαταρράσσεται η διαδικασία πρωτεϊνικής παραγωγής, και τελικώς, η φυσιολογία του οργανισμού.^{69,}
^{71.} Τα στελέχη είναι εμπορικά διαθέσιμα από την εταιρεία Lucigen (<https://www.lucigen.com/OverExpress-C41-DE3-and-C43-DE3-Competent-Cells>). Βασιζόμενοι στην παρατήρηση πως στα στελέχη C41(DE3) και C43(DE3) ο υποκινητής που ελέγχει την έκφραση της T7 RNAP είναι αποδυναμωμένος, δημιουργήθηκε το στέλεχος Lemo21(DE3), το οποίο προέρχεται κι αυτό από το στέλεχος BL21(DE3). Σε αυτό το στέλεχος, η δράση της T7 RNAP μπορεί να ρυθμιστεί πλήρως από το φυσικό της αναστολέα, την T7 λυσοζύμη. Συγκεκριμένα, το γονίδιο που κωδικοποιεί για την T7 λυσοζύμη βρίσκεται σε ένα πλασμιδίο υπό τον έλεγχο του υποκινητή της ραμνόζης. Έτσι, ρυθμίζοντας την ποσότητα της ραμνόζης, ελέγχεται τελικώς και η μεταγραφική ταχύτητα του γονιδίου που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη-στόχο^{71, 84.} Το στέλεχος αυτό είναι εμπορικά διαθέσιμο από την εταιρεία New England Biolabs (NEB) (<https://international.neb.com/products/c2528-lemo21de3-competent-e-coli#Product%20Information>).

Το στέλεχος Mutant56(DE3) απομονώθηκε προσφάτως και προέρχεται κι αυτό από το στέλεχος BL21(DE3). Η λειτουργία του βασίζεται σε μία αμινοξική αντικατάσταση στην T7 RNAP, η οποία καθιστά πιο αδύναμη την πρόσδεση της T7 RNAP στον υποδοχέα T7. Για τις περισσότερες μεμβρανικές πρωτεΐνες που δοκιμάστηκαν να παραχθούν σε αυτό το στέλεχος, οι συνολική αποδόσεις φαίνεται να ξεπερνούν τις αποδόσεις των στελεχών C41(DE3) και C43(DE3)^{85.}

Ένα άλλο σύστημα είναι αυτό όπου χρησιμοποιείται αυτό-επαγόμενο θρεπτικό μέσο (auto-induction media), και σε ορισμένες περιπτώσεις έχει

αποδειχτεί πως ίσως είναι και πολύ πιο αποτελεσματικό από την έκφραση χρησιμοποιώντας IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)⁸⁶. Σε αυτό το θρεπτικό μέσο εμπεριέχεται ένας συνδυασμός λακτόζης και γλυκόζης, σε ορισμένες αναλογίες. Όταν τα βακτήρια καταναλώσουν όλη την ποσότητα της γλυκόζης, τότε στρέφονται στην κατανάλωση της λακτόζης για παραγωγή ενέργειας, κι αυτομάτως ξεκινά η επαγωγή της πρωτεϊνικής παραγωγής, με παρόμοιο τρόπο όπως και με τη χρήση του IPTG.

Μία διαφορετική προσέγγιση, προκειμένου να βελτιωθούν οι συνολικές αποδόσεις σε επίπεδα πρωτεΐνης, αποτελεί η δημιουργία γενετικών τροποποιήσεων στον οργανισμό *E. coli*. Έτσι, έχουν δημιουργηθεί ποικίλα στελέχη. Η συμπαραγωγή γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες οι οποίες μετέχουν, εικάζεται πως μετέχουν, ή και όχι, στη διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης, όπως για παράδειγμα η πρωτεάση FtsH, η φωσφατάση NagD, τμήμα της λιποπρωτεΐνης NlpD, την DNA-συνδεόμενη YbaB κ.α., είχε ως αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή πολλών και διαφορετικών διαμεμβρανικών πρωτεϊνών στον οργανισμό *E. coli*.^{87, 88}.

Μία άλλη στρατηγική αποτελεί η κατάργηση της φυσιολογικής δράσης γονιδίων στον οργανισμό *E. coli* που κωδικοποιούν είτε για πρωτεάσες, οι οποίες ίσως επηρεάζουν αρνητικά την πρωτεϊνική παραγωγή, είτε για άλλες πρωτεΐνες, όπως για παράδειγμα η διαγραφή του γονιδίου που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη Trigger Factor (μειώνοντας έτσι τον ανταγωνισμό της δράσεως της πρωτεΐνης Trigger Factor έναντι της δράσεως του σωματιδίου αναγνώρισης σήματος (SRP))⁷⁸, είτε η παύση της δράσης του γονιδίου που κωδικοποιεί για την συν-μοριακό συνοδό DnaJ⁷⁴.

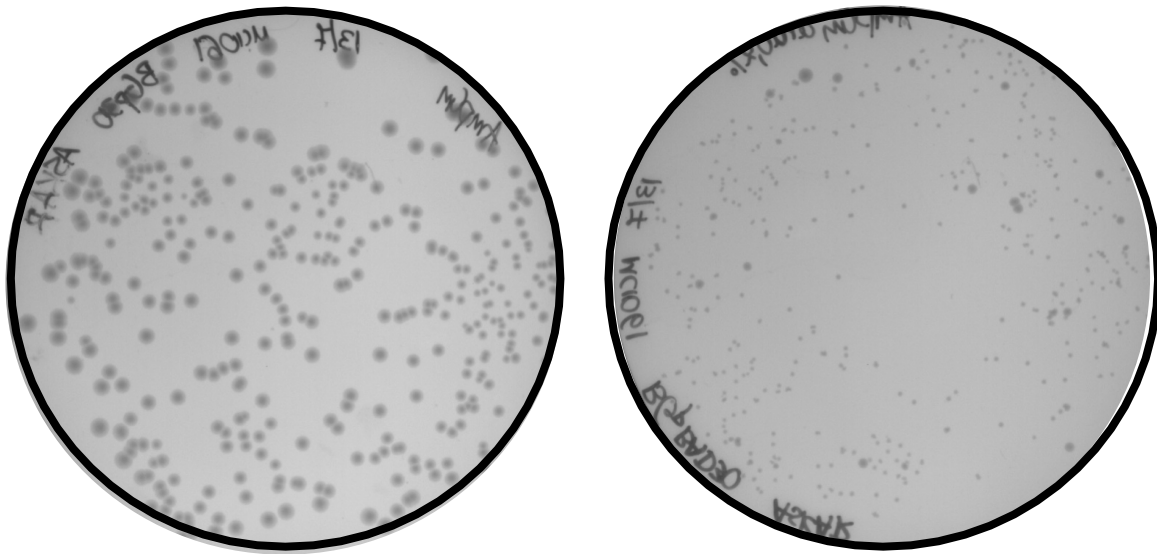
Κεφάλαιο 3 - Τα στελέχη SuptoxD και SuptoxR

3.1 Η ανάπτυξη των στελεχών SuptoxD και SuptoxR

Προκειμένου να κατασκευαστούν βακτηριακά στελέχη τα οποία να διακρίνονται από βελτιωμένες ιδιότητες όσον αφορά στην καταπολέμηση της τοξικότητας που επιφέρει η ετερόλογη παραγωγή διαμεμβρανικών πρωτεϊνών στον οργανισμό *E. coli*, καθώς επίσης και στην επιτυχή υπερπαραγωγή διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, ακολουθήθηκε προσέγγιση κατευθυνόμενης εξέλιξης για την πιθανή εύρεση μεμονωμένων *E. coli* γονιδίων, τα οποία κατά την υπερέκφρασή τους, να καταστέλλουν την επαγόμενη κυτταροτοξικότητα.

Για το σκοπό αυτό, η Δρ. Δήμητρα Γιαλαμά χρησιμοποίησε ως πρωτεΐνη-μοντέλο τον ανθρώπινο υποδοχέα της βραδυκινίνης 2 (BR2)⁷⁶. Ο υποδοχέας αυτός, κατά την υπερέκφρασή του στον οργανισμό *E. coli*, έχει αποδειχθεί εξαιρετικά τοξικός (Σχήμα 6), παρά το γεγονός ότι συσσωρεύεται σε πολύ μικρές ποσότητες στη μεμβράνη, χαρακτηριστικό που τον καθιστά άριστο μοντέλο για τη συγκεκριμένη πειραματική προσέγγιση που ακολουθήθηκε (Σχήμα 6). Χρησιμοποιώντας την πρωτεΐνη BR2, η Δρ. Δήμητρα Γιαλαμά ανέλυσε μία βιβλιοθήκη πλασμιδίων, ονόματι ASKA (A Complete Set of *Escherichia coli* K-12 ORF Archive). Η βιβλιοθήκη αυτή επιλέχθηκε καθώς αποτελεί μια συλλογή πλασμιδίων όπου κάθε πλασμίδιο εμπεριέχει κι ένα διαφορετικό ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του *E. coli*⁸⁹,

περιλαμβάνοντας έτσι περίπου 4000 πλασμίδια, άρα και όλα τα ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης του βακτηρίου *E. coli*.



Σχήμα 6: Η υπερπαραγωγή της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης BR2 προκαλεί σοβαρή κυτταροτοξικότητα.

Κύτταρα MC1061 *E. coli* τα οποία υπερπαραγωγή τον ανθρώπινο υποδοχέα BR2 σε στερεό θρεπτικό μέσο LB, χωρίς την προσθήκη (αριστερά) και με την προσθήκη (δεξιά) του επαγωγέα L- Αραβινόζης που ορίζει την παραγωγή ή μη της πρωτεΐνης. Το παραπάνω πείραμα διεξήχθη από τη Δρ. Δήμητρα Γιαλαμά. Προσαρμοσμένο σχήμα από Gialama et al.⁹⁰

Το γονίδιο που κωδικοποιούσε για την παραγωγή της πρωτεΐνης BR2 βρισκόταν κλωνοποιημένο σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα, και συγκεκριμένα στο πλασμίδιο pBAD33BR2-KanR, όπου και ήταν υπό τον έλεγχο του araBAD υποκινητή και του επαγωγέα του, της L(+) Αραβινόζης. Το συγκεκριμένο πλασμίδιο κατασκευάστηκε με τέτοιο τρόπο ώστε η παραγόμενη πρωτεΐνη να είναι χιμαιρική, και να φέρει στο αμινοτελικό της άκρο (N-terminus) τον επίτοπο FLAG για τον ανοσοεντοπισμό της, και στο καρβοξυτελικό της άκρο (C-terminus) το ένζυμο aminoglycoside 3'-phosphotransferase, το οποίο και προσδίδει στην παραγόμενη πρωτεΐνη ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό καναμυκίνη (Kan^R) κι έτσι μπορεί να

πιστοποιηθεί η παραγωγή πλήρους μήκους πρωτεΐνης BR2⁷⁵. Έχοντας προσδιορίσει, μετά από σειρά πειραμάτων, τη βέλτιστη συγκέντρωση του επαγωγέα της αραβινόζης, καθώς και του αντιβιοτικού της καναμυκίνης, που χρειαζόταν προκειμένου να γίνεται εμφανής η τοξικότητα που προκαλείται από την παραγωγή της βραδυκινίνης και ταυτοχρόνως να μην επηρεάζεται η ομαλή ανάπτυξη των κυττάρων, ακολούθησαν οι πειραματικές διαδικασίες της κατευθυνόμενης εξέλιξης.

Προκειμένου να μελετηθεί ο βαθμός της κυτταροτοξικότητας που προκαλείται στον οργανισμό *E. coli* από την παραγωγή της πρωτεΐνης BR2 και να οριστεί ο συγκεκριμένος φαινότυπος, *E. coli* κύτταρα MC1061 μετασχηματίστηκαν με τον πλασμιδιακό φορέα pBAD33BR2-KanR. Τα κύτταρα που προέκυψαν μεγάλωσαν σε τρυβλία τα οποία μέσα στο LB θρεπτικό μέσο, είτε περιείχαν τον επαγωγέα αραβινόζη, είτε όχι, με σκοπό να αποτυπωθεί ο φαινότυπος της παραγωγής της BR2 (εμφανής τοξικότητα του οργανισμού *E. coli*) και να συγκριθεί με τη μη ύπαρξη τοξικότητας όταν η πρωτεΐνη δεν παράγεται (απουσία του επαγωγέα L-Αραβινόζης) (Σχήμα 6). Αφού αποτυπώθηκε ο φαινότυπος, και διαπιστώθηκε πως ήταν προφανής και σε υγρές καλλιέργειες αντίστοιχα παρουσίας ή μη του αντιβιοτικού της καναμυκίνης, ακολούθησε αναζήτηση πιθανών γονιδίων-καταστολέων από τη χρήση της βιβλιοθήκης ASKA.

Κατά τη διαδικασία αυτή, επιλεκτικά κύτταρα MC1061 μετασχηματίστηκαν με τη πρωτεΐνη-μοντέλο BR2 (pBAD30BR2-Kan) καθώς και με τη βιβλιοθήκη ASKA, της οποίας όλα τα ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης βρίσκονταν υπό τον έλεγχο του T5lac υποκινητή. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα μεγάλωσαν σε τρυβλία τα οποία μέσα στο LB θρεπτικό μέσο, περιείχαν τα αντιβιοτικά που εξασφάλιζαν τη διατήρηση των πλασμιδίων που χρησιμοποιήθηκαν, κατάλληλη συγκέντρωση του

επαγωγέα L- Αραβινόζη (επαγωγή διαμεμβρανικής πρωτεΐνης BR2), το αντιβιοτικό καναμυκίνη σε χαμηλή συγκέντρωση προκειμένου να εξασφαλιστεί πως η παραγόμενη πρωτεΐνη BR2 είναι πλήρους μήκους, καθώς και τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις (0, 0.01, 0.1 mM) του επαγωγέα IPTG, προκειμένου να επαχθεί η υπερέκφραση των γονιδίων που εμπεριέχει η βιβλιοθήκη ASKA. Μετά τη δοκιμή των τριών αυτών διαφορετικών συγκεντρώσεων επαγωγέα, βρέθηκε πως οι χαμηλές συγκεντρώσεις βοηθούν στην ομαλή ανάπτυξη των κυττάρων, κι έτσι μπορεί να ανιχνευθεί εύκολα η ευεργετική δράση πιθανών γονιδίων-καταστολέων της βιβλιοθήκης. Μετά το πέρας 48 ωρών επώασης των τρυβλίων στους 30 °C, επήλθε ο σχηματισμός αποικιών. Η πλειοψηφία απαρτιζόταν από μικρού μεγέθους αποικίες, που χαρακτηρίζονταν από εμφανή φαινότυπο τοξικότητας για τον οργανισμό *E. coli* από την παραγωγή της πρωτεΐνης BR2, ενώ ανάμεσά τους ξεχώριζαν και 140 αποικίες εμφανώς μεγαλύτερου μεγέθους. Οι αποικίες αυτές επιλέχθηκαν, ακολούθησε καλλιέργειά τους σε υγρό θρεπτικό μέσο, και εν συνεχεία απομονώθηκαν τα πλασμίδια της βιβλιοθήκης ASKA που αυτές περιείχαν. Αφότου εξασφαλίστηκε, με διαφορετικές πειραματικές προσεγγίσεις, πως ο παρατηρούμενος φαινότυπος της καταστολής της τοξικότητας που παρατηρείτο οφειλόταν στα γονίδια από τη βιβλιοθήκη ASKA που έφεραν αυτές οι επιλεγμένες αποικίες, κι όχι σε τυχαίες μεταλλάξεις που είχαν προκύψει στο πλασμίδιο που κωδικοποιούσε για την πρωτεΐνη BR2 ή στο χρωμόσωμα των κυττάρων, ακολούθησε ενδελεχής μελέτη των επιλεγμένων ASKA γονιδίων.

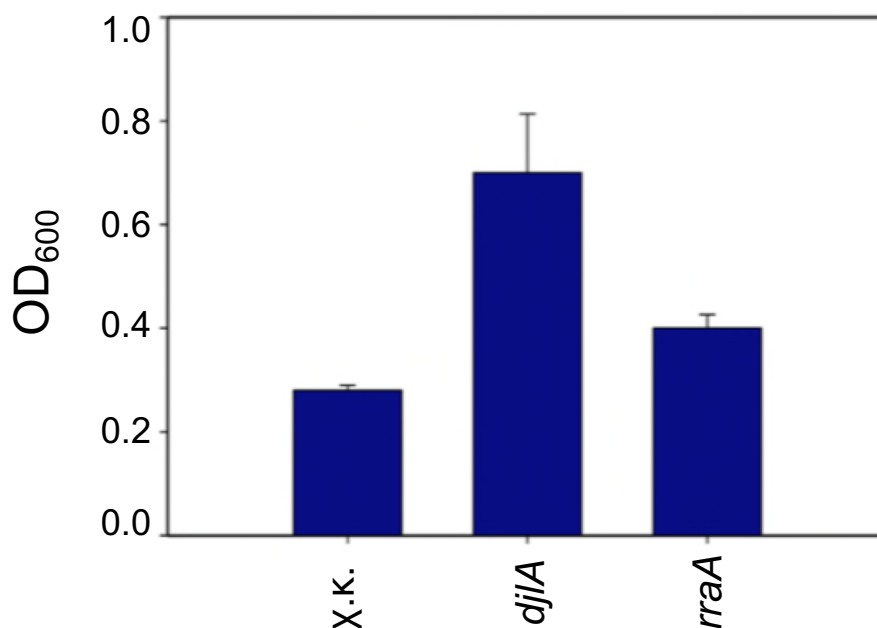
Καθώς υπήρχε πιθανότητα τα επιλεγμένα γονίδια να βελτιώνουν τον φαινότυπο της κυτταροτοξικότητας εξαιτίας της μείωσης που προκαλούν στη μεταγραφή ή/και στη μετάφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί για την παραγωγή

BR2, παρακολουθήσαμε τη συσσώρευση της BR2 παρουσία ή μη των επιλεγμένων γονιδίων μετρώντας τον φθορισμό κυττάρων MC1061 τα οποία υπερεκφράζουν τη χιμαιρική κατασκευή BR2-GFP. Σε αυτή την κατασκευή, προκειμένου να μπορεί να παρακολουθηθεί εύκολα και γρήγορα η πρωτεϊνική παραγωγή, η πρωτεΐνη BR2 βρίσκοταν συζευγμένη με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) στο καρβοξυτελικό της άκρο (C terminus). Η επιλογή χρήσης της χιμαιρικής αυτής κατασκευής βασίστηκε στο γεγονός πως ο φθορισμός που ανιχνεύεται σε μία καλλιέργεια *E. coli* κυττάρων που εκφράζουν μία τέτοια πρωτεΐνη έχει αποδειχθεί πως συσχετίζεται άμεσα με την ποσότητα της πρωτεΐνης που παράγεται και ενσωματώνεται στη μεμβράνη (Σχήμα 8, πάνω)^{91, 92}. Έτσι, επιδεικτικά *E. coli* κύτταρα MC1061 μετασχηματίστηκαν με το πλασμίδιο pBAD30BR2-GFP και με καθένα από τα 100 διαφορετικά ASKA πλασμίδια που επιλέχθηκαν και δεν έφεραν μεταλλάξεις, καθώς και με πλασμίδια- μάρτυρες που είχαν επιλεγεί τυχαία από την ASKA. Από τα 100 διαφορετικά πλασμίδια που δοκιμάστηκαν, μόνο κατά την χρήση των 15 παρατηρήθηκε σαφής καταστολή της επαγόμενης κυτταροτοξικότητας και αύξηση του κυτταρικού φθορισμού, κατά ίσο ή και σαφώς μεγαλύτερο βαθμό, συγκριτικά με τα κύτταρα που έφεραν τα τυχαία πλασμίδια-μάρτυρες. Εν συνεχεία, τα 15 αυτά πλασμίδια απομονώθηκαν και τα γονίδια που περιείχαν αλληλουχήθηκαν.

Κατά την αλληλούχηση, διαπιστώθηκε πως οι 4 από τους 15 κλώνους περιείχαν το γονίδιο *djlA*, ενώ οι υπόλοιποι 11 το γονίδιο *rraA*. Τα γονίδια αυτά διακρίνονταν για 2 βασικές ιδιότητες: ως καταστολείς της τοξικότητας, και εν συνεχεία, για την ικανότητά τους να προάγουν σε μεγάλο βαθμό την επιτυχή υπερπαραγωγή της BR2 ανά κύτταρο. Μετά από πειραματικές δοκιμές, διαπιστώθηκε επίσης πως η ευεργετική επίδραση των γονιδίων αυτών κατά την

υπερπαραγωγή τοξικών πρωτεϊνών, βρέθηκε να είναι ανεξάρτητη του υποκινητή, του πλασμιδίου καθώς και του *E. coli* στελέχους⁹⁰.

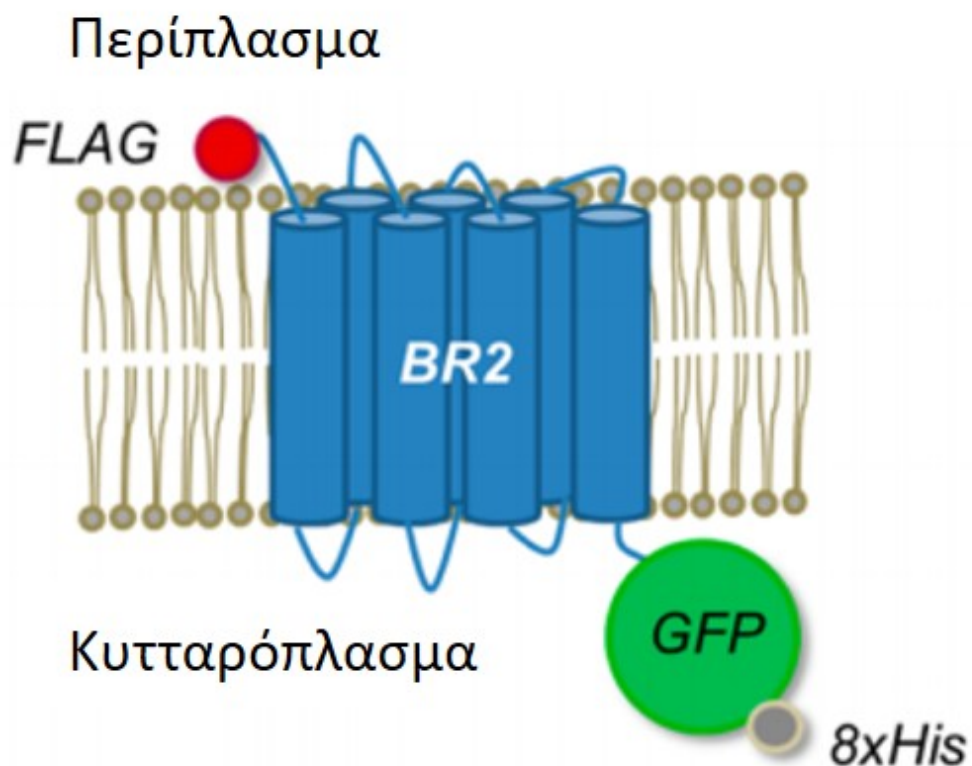
Κατά τη συνέκφραση κάθε γονιδίου με το γονίδιο που κωδικοποιεί για τη BR2, παρατηρείται ιδιαίτερος βελτιωμένη εικόνα στην ανάπτυξη των κυττάρων, συγκριτικά πάντα με τα κύτταρα που δεν εκφράζουν κανένα από τα δύο γονίδια, *djlA* ή *rraA* (Σχήμα 7).

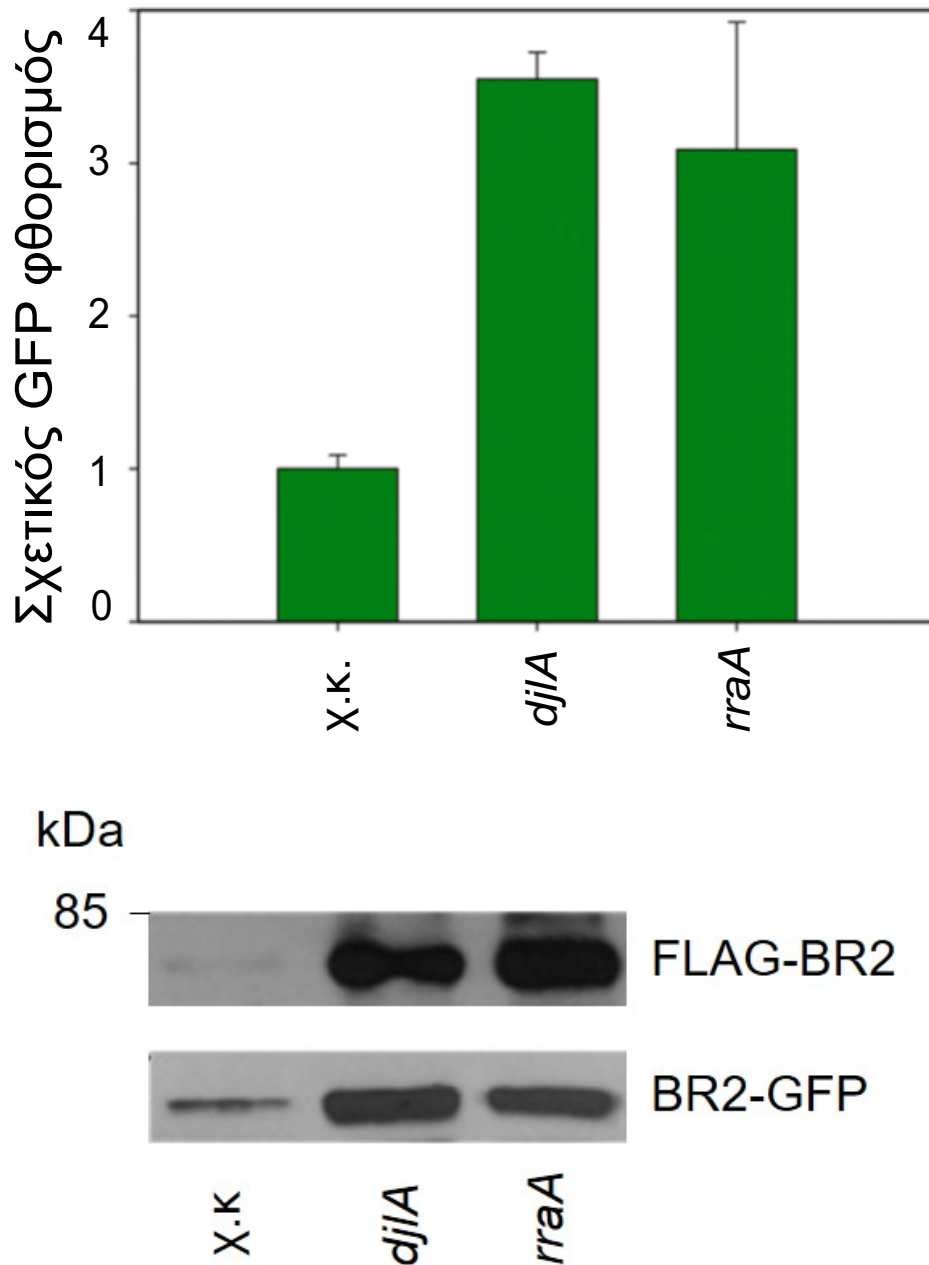


Σχήμα 7: Τα γονίδια *djlA* και *rraA*, κατά την υπερέκφρασή τους, δρουν ως καταστολείς της κυτταροτοξικότητας, προάγοντας την κυτταρική ανάπτυξη.

Μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 600nm, από ίσο όγκο καλλιέργειας, όπου παράγεται η χημική πρωτεΐνη BR2-GFP μετά από προσθήκη 0.2 μg/mL aTc και 100*10⁻⁴ % w/v (για τις καλλιέργειες χωρίς καταστολείς και για τις καλλιέργειες όπου συν εκφράστηκε το γονίδιο *djlA*) ή 200*10⁻³ % w/v (για τις καλλιέργειες όπου συν εκφράστηκε το γονίδιο *rraA*) L(+) αραβινόζης για 16 ώρες στους 25 °C. Οι μετρήσεις έχουν πραγματοποιηθεί σε τριπλές καλλιέργειες, τουλάχιστον 3 ανεξάρτητες φορές, και τα σφάλματα αντιπροσωπεύουν μία τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή (± s.e.m.). Τα παραπάνω πειράματα διεξήχθησαν από τη Δρ. Δήμητρα Γιαλαμά. Προσαρμοσμένο σχήμα από Gialama et al.⁹⁰.

Επίσης, ως αποτέλεσμα της δράσης του ενός ή του άλλου γονιδίου-καταστολέα, ανιχνεύεται μεγάλη αύξηση της παραγωγής της BR2 (Σχήμα 8, μέση), καθώς επίσης επιβεβαιώθηκε πως ο αυξημένος κυτταρικός φθορισμός που παρατηρήθηκε οφείλεται σε αυξημένη παραγωγή πλήρους μήκους, σωστά ενσωματωμένης και αναδιπλωμένης διαμεμβρανικής πρωτεΐνης BR2 (με ή χωρίς τη χρήση της πρωτεΐνης GFP), όπως γίνεται εμφανές και από το σχήμα 8 (κάτω). Η διαπίστωση αυτή προέκυψε μετά την ανάλυση της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης BR2 σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες και ανάλυσή της μετά από ανοσοαποτύπωση κατά Western.





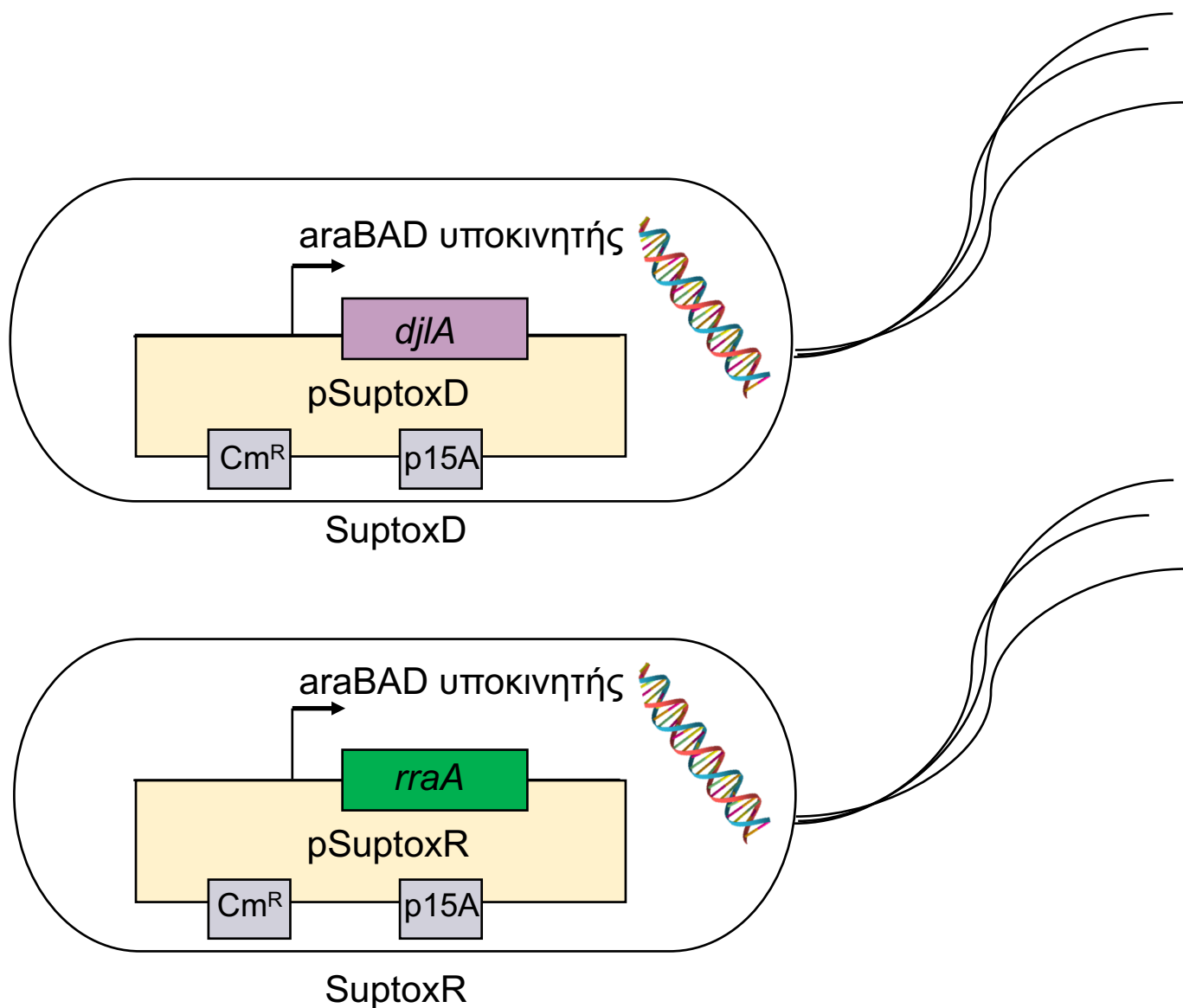
Σχήμα 8: Η υπερέκφραση των γονιδίων *djlA* και *rraA* κατά την παραγωγή της χιμαιρικής πρωτεΐνης BR2-GFP στον οργανισμό *E. coli* βοηθούν σημαντικά την κυτταρική αύξηση της παραγωγής της διαδιαμεμβρανικής πρωτεΐνης.

(Πάνω) Σχηματική αναπαράσταση της χιμαιρικής πρωτεΐνης BR2-GFP. Η πρωτεΐνη GFP βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο (C terminus) της BR2, όπου και υπό φυσιολογικές συνθήκες, εδράζεται στο κυτταρόπλασμα. Στο ίδιο άκρο έχει προστεθεί

κι ένα επίτοπος ιστιδίνης (8xHIS, καθώς κι ένας επίτοπος FLAG στο αμινοτελικό άκρο (N-terminus). (Μέση) Διάγραμμα μέτρησης σχετικού GFP φθορισμού ίσου αριθμού κυττάρων τα οποία παράγουν τη χιμαιρική πρωτεΐνη BR2-GFP μετά από προσθήκη αραβινόζης και ανυδροτετρακυκλίνης για 16 h στους 25 °C. Ο φθορισμός των κυττάρων που παράγουν τη χιμαιρική πρωτεΐνη απουσία καταστολέα έχει οριστεί ως μονάδα. Οι μετρήσεις έχουν πραγματοποιηθεί σε τριπλές καλλιέργειες, τουλάχιστον 3 ανεξάρτητες φορές, και τα σφάλματα αντιπροσωπεύουν μία τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή (\pm s.e.m.). (Κάτω) Ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες, και ανοσοαποτύπωση κατά Western απομονωμένων ολικών μεμβρανών από κύτταρα που δεν περιέχουν καταστολέα κι από κύτταρα που συνεκφράζουν το γονίδιο *djlA* ή *rraA*, προέρχονται από ίσο αριθμό κυττάρων και παράγουν την πρωτεΐνη BR2 ή τη χιμαιρική πρωτεΐνη BR2-GFP, χρησιμοποιώντας το αντίσωμα αντι-FLAG που στοχεύει στο N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης, ή το αντίσωμα αντι-HIS που στοχεύει στο C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης, σε δείγματα όπου έχει προηγηθεί βρασμό. Τα παραπάνω πειράματα διεξήχθησαν από τη Δρ. Δήμητρα Γιαλαμά. Προσαρμοσμένο σχήμα από Gialama et al.⁹⁰

Μετά τη διαπίστωση των πλεονεκτημάτων των δύο αυτών γονιδίων, κατασκευάστηκαν δύο νέα *E. coli* στελέχη: το SuptoxD, το οποίο φέρει το γονίδιο *djlA* και το SuptoxR που φέρει το γονίδιο *rraA* (Σχήμα 9). Στα νέα αυτά στελέχη, τα γονίδια *djlA* και *rraA* τέθηκαν υπό τον έλεγχο του υποκινητή araBAD, στο χαμηλού αριθμού αντιγράφων, πλασμιδιακό φορέα pBAD33, ενώ η εκάστοτε διαμεμβρανική πρωτεΐνη προς παραγωγή υπό τον έλεγχο του υποκινητή tet, στον υψηλού αριθμού αντιγράφων, πλασμιδιακό φορέα pASK75. Με τη χρήση των δύο αυτών στελεχών, διαπιστώθηκαν πολλά πλεονεκτήματα κατά τη διαδικασία της υπερέκφρασης δύσκολων και τοξικών ή μη, διαμεμβρανικών πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, η αυξημένη ποσότητα της παραγόμενης διαμεμβρανικής πρωτεΐνης, συγκριτικά με τα κύτταρα αγρίου τύπου, ενσωματώνεται στη μεμβράνη με τη σωστή τοπολογία N_{περίπλασμα}-C_{κυτταρόπλασμα} ⁹³. Επίσης, διαπιστώθηκε πως οι παραγόμενες πρωτεΐνες είχαν σωστά αναδιπλωμένη διαμόρφωση, γεγονός που σημαίνει πως η χρήση των στελεχών SuptoxD και SuptoxR, όχι μόνο βοηθά στην αυξημένη

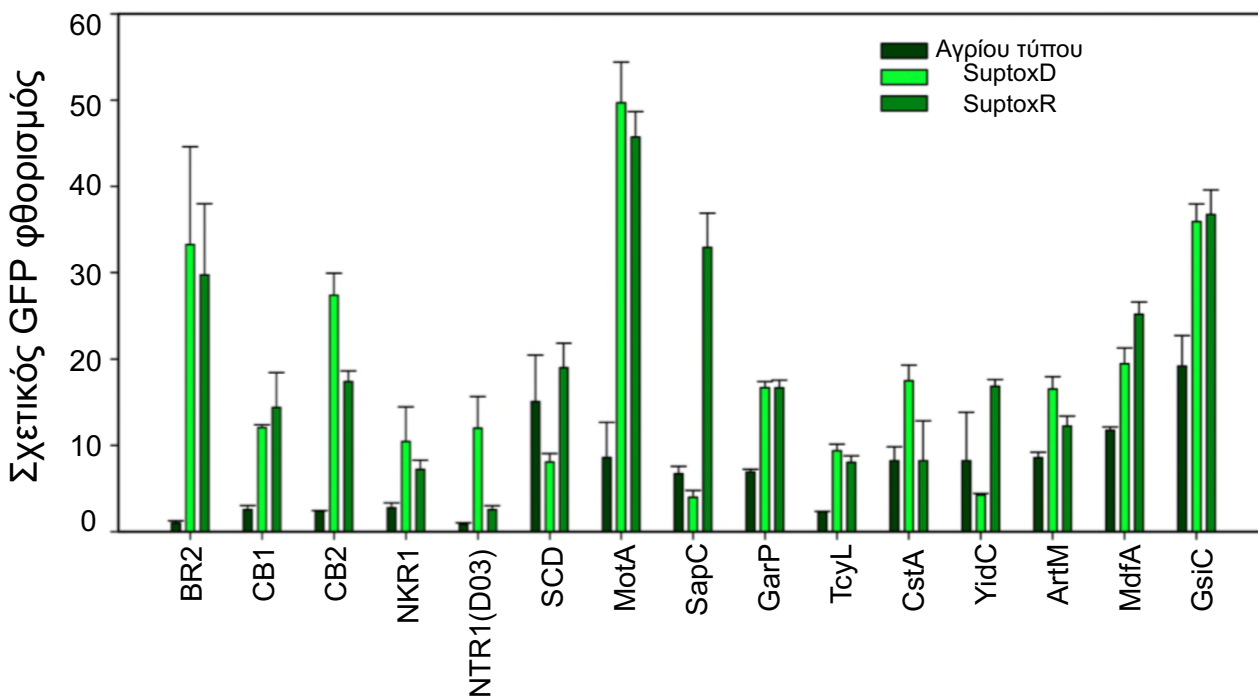
παραγωγή διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, αλλά ταυτοχρόνως συμμετέχει και στη σωστή αναδίπλωση τους. Επιπλέον, εξετάστηκε αν οι σωστά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες αυτές διατηρούσαν και τη λειτουργικότητά τους ή όχι. Πράγματι, με τη χρήση του στελέχους SuptoxD για την υπερπαραγωγή του υποδοχέα νευροτενσίνης 1 (NTR1(D03)), διαπιστώθηκε καταστολή της κυτταροτοξικότητας, σημαντική αύξηση της συνολικής παραγωγής της πρωτεΐνης και εν συνεχεία, πως η λειτουργική έκφραση του συγκεκριμένου υποδοχέα ήταν 5 φορές περισσότερη ανά κύτταρο συγκριτικά με τα κύτταρα αγρίου τύπου.



Σχήμα 9: Απεικόνιση των *E. coli* στελεχών SuptoxD και SuptoxR.

Οι ευεργετικές ιδιότητες των στελεχών SuptoxD και SuptoxR οφείλονται στην υπερέκφραση των *E. coli* γονιδίων *djlA* και *rraA* αντίστοιχα. Τα γονίδια εκφράζονται από τους πλασμιδιακούς φορείς pSuptoxD και pSuptoxR και βρίσκονται υπό τον έλεγχο του υποκινητή araBAD και του επαγωγέα του, της L(+) Αραβινόζης.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός πως η ευεργετική δράση των στελεχών αυτών είναι ευρείας εφαρμογής: μετά από εξέταση πολλών διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, τόσο ευκαρυωτικής όσο και προκαρυωτικής προελεύσεως, που διακρίνονταν από διαφορετικά χαρακτηριστικά (βιοχημικές ιδιότητες, αριθμό διαμεμβρανικών τμημάτων, μέγεθος, λειτουργία κτλ.) και κυμαινόμενα επίπεδα τοξικότητας, διεπιστώθη αξιοσημείωτη βελτίωση στην παραγωγή κάθε υπό μελέτη πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, σε όλες τις πρωτεΐνες που εξετάστηκαν, μετά από παραγωγή τους στα στελέχη SuptoxD και SuptoxR, συσσωρεύονταν σε αυξημένα επίπεδα, είτε στο ένα, είτε στο άλλο, είτε και στα δύο, συγκριτικά με τα κύτταρα αγρίου τύπου, ανεξαρτήτως στελέχους *E. coli*⁹⁰ (Σχήμα 10).



Σχήμα 10: Οι ευεργετικές ιδιότητες των στελεχών SuptoxD και SuptoxR εφαρμόζονται σε ένα εύρος διαφορετικών διαμεμβρανικών πρωτεϊνών.

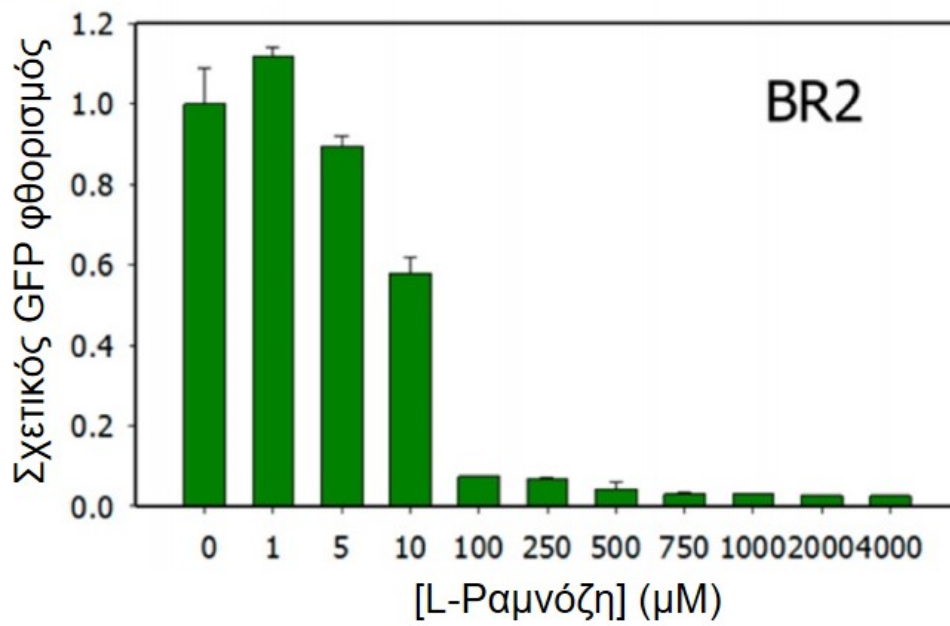
Διάγραμμα μέτρησης σχετικού GFP φθορισμού κυττάρων που προέρχονται από ίσο όγκο καλλιέργειας και παράγουν μεμβρανικές πρωτεΐνες συζευγμένες με GFP, μετά από προσθήκη $100 \cdot 10^{-4} \% w/v$ (καλλιέργειες αγρίου τύπου και SuptoxD) ή $200 \cdot 10^{-3} \% w/v$ (καλλιέργειες SuptoxR) L(+) αραβινόζης και $200 \mu g/L$ ανυδροτετρακυκλίνης για 16 h στους $25^\circ C$. Ο φθορισμός των κυττάρων που παράγουν τη πρωτεΐνη BR2-GFP χωρίς τη χρήση καταστολέα ορίστηκε ως μονάδα. Οι μετρήσεις έχουν πραγματοποιηθεί σε τριπλές καλλιέργειες, τουλάχιστον 3 ανεξάρτητες φορές, και τα σφάλματα αντιπροσωπεύουν μία τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή ($\pm s.e.m.$). Τα παραπάνω πειράματα διεξήχθησαν από τη Δρ. Δήμητρα Γιαλαμά και τη Δρ. Καλλιόπη Κωστελίδου. Προσαρμοσμένο σχήμα από Gialama et al.⁹⁰

3.2 Τα SuptoxD και SuptoxR ξεπερνούν σε αποδόσεις τα υπάρχοντα εμπορικά στελέχη

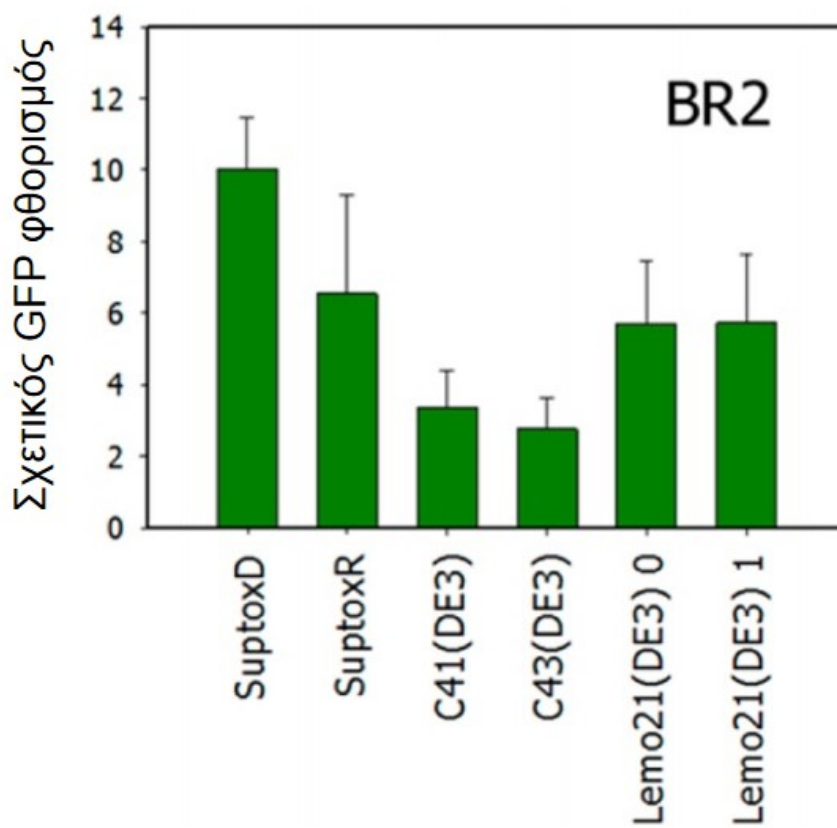
Όπως αναφέρθηκε, προκειμένου να επιτευχθεί υπερπαραγωγή διαμεμβρανικών πρωτεϊνών στο βακτήριο *E. coli* και δεδομένων των σοβαρών προβλημάτων που προκύπτουν από τη διαδικασία της υπερέκφρασης, πολλά διαφορετικά συστήματα έχουν σχεδιαστεί. Τα πλέον γνωστά και χρησιμοποιούμενα στελέχη *E. coli*, τα οποία εξειδικεύονται στην παραγωγή δύσκολων και τοξικών πρωτεϊνών (στις οποίες συγκαταλέγονται και οι μεμβρανικές), είναι τα C41, C43, και Lemo21(DE3). Μετά από σειρά πειραμάτων που διεξάγαμε, προσδιορίστηκε για κάθε ξεχωριστή μεμβρανοπρωτεΐνη που δοκιμάστηκε, η κατάλληλη συγκέντρωση ραμνόζης που απαιτείται κατά τη χρήση του στελέχους Lemo21(DE3).

Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε συγκριτική έκφραση κάθε μεμβρανοπρωτεΐνης στα στελέχη SuptoxD, SuptoxR, C41, C43 και Lemo21(DE3). Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών έδειξαν πως για όλες τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που μελετήσαμε, τόσο προκαρυωτικής όσο ευκαρυωτικής προελεύσεως, είτε το στέλεχος SuptoxD είτε το SuptoxR είτε και τα δύο, ξεπέρασαν σημαντικά σε αποδόσεις τα εμπορικά διαθέσιμα στελέχη (Σχήμα 11).

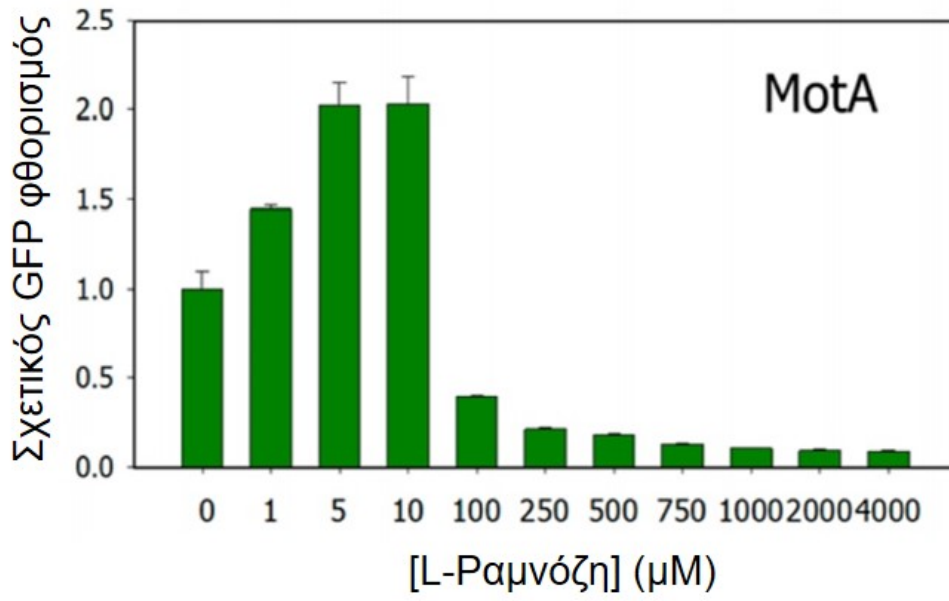
(α)



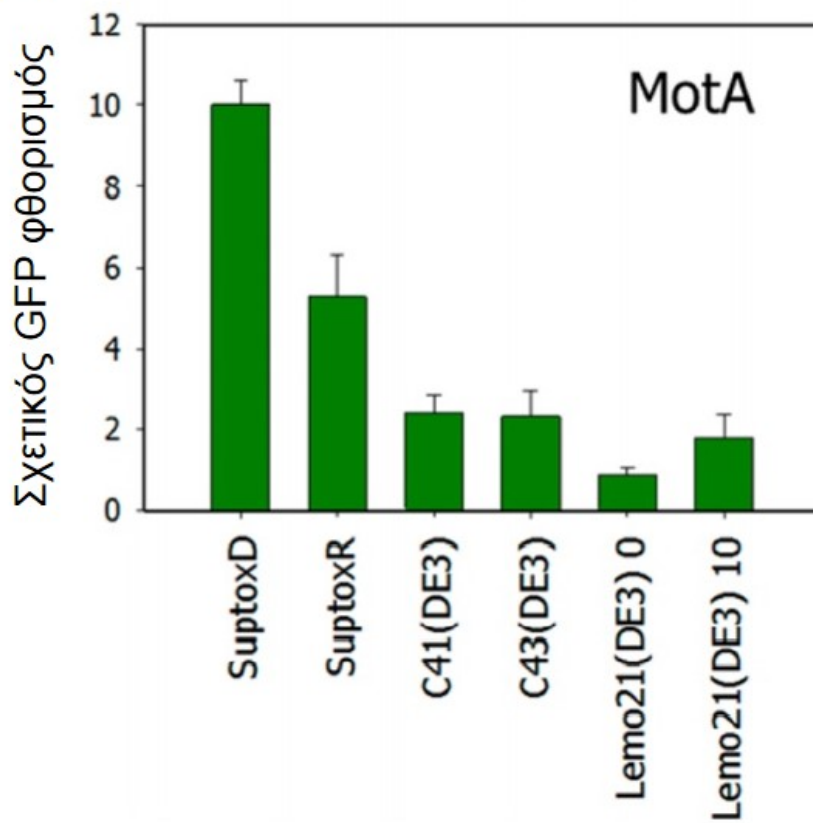
(β)



(γ)



(δ)



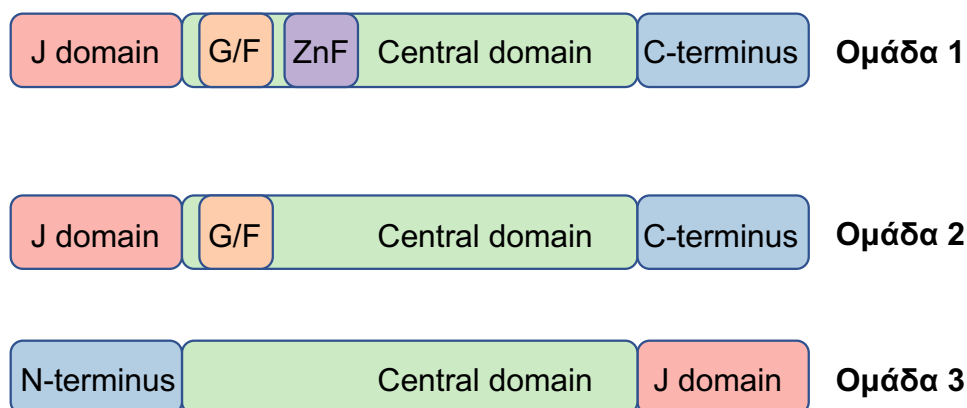
Σχήμα 11: Τα στελέχη SuptoxD και SuptoxR ξεπερνούν σε αποδόσεις τα εμπορικά διαθέσιμα στελέχη.

Διαγράμματα συγκριτικής πρωτεϊνικής παραγωγής των στελεχών SuptoxD και SuptoxR με τα εμπορικά στελέχη C41, C43 και Lemo21 μέσω μέτρησης σχετικού GFP φθορισμού κυττάρων που προέρχονται από ίσο όγκο καλλιέργειας και παράγουν μεμβρανικές πρωτεΐνες συζευγμένες με GFP.(α) Συγκριτική μελέτη διαφορετικών ποσοτήτων του επαγωγέα L-Ραμνόζης για τη βελτιστοποίηση της υπερπαραγωγής της χιμαιρικής πρωτεΐνης BR2-GFP από το pETBR2-GFP σε κύτταρα Lemo21. (β) Σύγκριση φθορισμού ίσου όγκου κυττάρων SuptoxD και SuptoxR που παράγουν τη χιμαιρική πρωτεΐνη BR2-GFP από το pASKBR2-GFP μετά από προσθήκη 0.2 μg/mL aTc και εύρους συγκεντρώσεων L(+) αραβινόζης, για 16 ώρες στους 25 °C, με τον φθορισμό ίσου όγκου κυττάρων C41, C43 και Lemo21 που παράγουν την ίδια πρωτεΐνη από το pETBR2-GFP μετά από προσθήκη 0.4 mM IPTG για 16 ώρες στους 25 °C. Η παραγωγή της χιμαιρικής πρωτεΐνης BR2-GFP στα κύτταρα Lemo21 πραγματοποιήθηκε με την προσδιορισμένη βέλτιστη συγκέντρωση L-Ραμνόζης (όπως αυτή προσδιορίστηκε από το (α)), όπως επίσης και απουσία αυτής. (γ)(δ) Για τη χιμαιρική πρωτεΐνη MotA-GFP όπως στο (α) (β) αντιστοίχως. Τα πειράματα έχουν πραγματοποιηθεί σε τριπλές καλλιέργειες, τουλάχιστον 2 ανεξάρτητες φορές, και τα σφάλματα αντιπροσωπεύουν μία τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή (\pm s.e.m.). Τα παραπάνω πειράματα διεξήχθησαν από τη Δρ. Δήμητρα Γιαλαμά και την υποψήφια διδάκτορα Μυρσίνη Μίχου. Προσαρμοσμένο σχήμα από Gialama et al.⁹⁰

3.3 Τα χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών DjlA και RraA

3.3.1 DjlA: μία J-πρωτεΐνη μοναδικών ιδιοτήτων

Η πρωτεΐνη DjlA (DnaJ-like protein A) αποτελεί μέλος μιας μεγάλης οικογένειας θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών-συν-μοριακών συνοδών, την οικογένεια Hsp40 (Heat shock proteins 40). Τα μέλη αυτής της οικογένειας, κατηγοριοποιούνται σε τρεις ομάδες: τύπου 1, 2 και 3. Στις πρωτεΐνες και των 3 ομάδων βρίσκεται μία περιοχή που ονομάζεται J υπομονάδα, και η θέση αυτής εντοπίζεται είτε στο αμινοτελικό άκρο (N-terminus) (Ομάδες 1 και 2), είτε οπουδήποτε μέσα στην αμινοξική ακολουθία της πρωτεΐνης (Ομάδα 3). Εξαιτίας της ύπαρξης αυτής της περιοχής, οι πρωτεΐνες αυτές ονομάζονται και J-πρωτεΐνες. Η DjlA ανήκει στην ομάδα 3 καθώς η J υπομονάδα βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης (C-terminus)(Σχήμα 12).



Σχήμα 12: Σχηματική απεικόνιση της δομής των 3 διαφορετικών ομάδων των J- πρωτεϊνών.

Οι J- πρωτεΐνες αποτελούνται από 3 βασικές υπομονάδες: τη J υπομονάδα (ροζ) όπου για τις πρωτεΐνες της ομάδας 1 και 2 εδράζεται στο αμινοτελικό άκρο (N-terminus), το κεντρικό τμήμα (πράσινο) και την καρβοξυτελική υπομονάδα (μπλε για τις ομάδες 1 και 2), όπου για τα περισσότερα μέλη της ομάδας 3, εντοπίζεται και η J υπομονάδα. Οι ομάδες 1 και 2 φέρουν και μία υπομονάδα πλούσια στα αμινοξέα γλυκίνη/φαινυλαλανίνη (πορτοκαλί) και η ομάδα 1 φέρει επίσης και μία υπομονάδα πρόσδεσης ψευδαργύρου.

Η J υπομονάδα, η οποία περιέχει ένα συντηρημένο μοτίβο τριπεπτιδίου His-Pro-Asp (HPD), αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες της οικογένειας Hsp70 (Heat shock proteins 70)⁹⁴. Οι πρωτεΐνες Hsp70, που αποτελούν τις πιο καλά μελετημένες μοριακούς συνοδούς, κατέχουν πολύ σημαντικό ρόλο στην εύρυθμη λειτουργία ενός οργανισμού^{95, 96}. Εντοπίζονται από τα αρχαία έως τον άνθρωπο καθώς αποτελούν κεντρικό παράγοντα στην κυτταρική απόκριση σε διάφορα είδη στρες. Πιο συγκεκριμένα, αλληλοεπιδρούν με ένα εύρος διαφορετικών πρωτεϊνών προκειμένου να συνδράμουν καθοριστικά στη διαδικασία της αναδίπλωσης τους και/ή της ελεγχόμενης αποικοδόμησής τους. Υπό στρεσογόνες συνθήκες, οι μοριακοί συνοδοί Hsp70 κατέχουν κεντρικό ρόλο βοηθώντας να αποφευχθεί ο σχηματισμός και/ή η συσσώρευση λανθασμένων πρωτεϊνικών διαμορφώσεων.

Στον οργανισμό *E. coli*, υπάρχουν τρεις μοριακοί Hsp70 συνοδοί: η DnaK, η HscA και η HscC, με την πρώτη τελευταία να κατέχει κυρίαρχο ρόλο ως η βασική μοριακή συνοδός του *E. coli*⁹⁷. Εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, (το 25% της συνολικής της ποσότητας εντοπίζεται συνδεδεμένο με τη μεμβράνη⁹⁸) και είναι απαραίτητη για την επιβίωση των βακτηρίων όταν αυτά υπόκεινται σε αντιξοότητες, όπως πχ οι ακραίες θερμοκρασίες ή σε θερμοκρασίες που αποκλίνουν από τη συνήθη για την ανάπτυξη των βακτηρίων⁹⁹. Υπό τις συνθήκες αυτές, η DnaK αποτρέπει τη συσσώρευση των λανθασμένως αναδιπλωμένων πρωτεϊνών και εν συνεχεία, συνεισφέρει στη σωστή αναδίπλωσή τους¹⁰⁰. Σε φυσιολογικές συνθήκες, η DnaK βοηθά στη φυσιολογική ανάπτυξη και ομοίωση των κυττάρων, καθώς είναι η πλέον άφθονη κυτταροπλασματική πρωτεΐνη. Ανάμεσα στις άλλες λειτουργίες που επιτελεί, ξεχωρίζει η αναδίπλωση των νεοσυστατών πρωτεϊνών, η μεταφορά πρωτεϊνών, ο σχηματισμός και η αποδόμηση πρωτεϊνικών συμπλόκων, καθώς και η

ενεργοποίηση της διαδικασίας της πρωτεόλυσης προβληματικά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών.

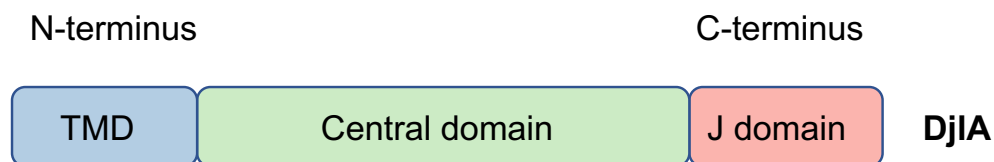
Προκειμένου η DnaK να είναι λειτουργική, απαραίτητη προϋπόθεση αποτελεί η σύνδεσή της με μία συν-μοριακό συνοδό Hsp40, με βασική εκπρόσωπο στο *E. coli* την DnaJ, η οποία και "κλειδώνει" τη σύνδεση της DnaK με την εκάστοτε πρωτεΐνη, παρέχοντας σταθερότητα στο σύμπλοκο αυτό, όπως επιβεβαιώθηκε και προσφάτως μετά από μελέτη κρυστάλλωσης αυτής της αλληλεπίδρασης¹⁰¹. Όπως ήδη αναφέρθηκε, οι συν-μοριακοί συνοδοί Hsp40 χαρακτηρίζονται από μία J υπομονάδα (J-πρωτεΐνες), η οποία είναι και το τμήμα που αλληλεπιδρά άμεσα με την DnaK, προκαλώντας την ενεργότητα της ATPάσης της, και τελικώς βοηθώντας τη σύνδεση της εκάστοτε πρωτεΐνης σε αυτήν, μέσω αλλαγής της διαμόρφωσής της¹⁰²⁻¹⁰⁴. Μεγάλο ενδιαφέρον προκαλεί η παρουσία πολλαπλών διαφορετικών «ζευγών» μοριακού συνοδού/ J-πρωτεΐνης, γεγονός που ενισχύει τις εικασίες πως συγκεκριμένα ζεύγη εμπλέκονται σε συγκεκριμένες διαδικασίες, εξειδικεύοντας έτσι περισσότερο τους ήδη γνωστούς μηχανισμούς. Επιπλέον, οι J-πρωτεΐνες είναι αριθμητικά περισσότερες συγκρινόμενες με τους μοριακούς συνοδούς Hsp70, με τους οποίους και συνδέονται.

Οι J-πρωτεΐνες που εντοπίζονται στο βακτήριο *E. coli* είναι οι DnaJ, CbpA, DjlA, HscB, DjlB και DjlC. Για τις 3 τελευταίες έχει βρεθεί ότι δεν αλληλοεπιδρούν με τη DnaK⁹⁷. Αξίζει να σημειωθεί σε αυτό το σημείο πως οι DjlB και DjlC δε διαθέτουν το συντηρημένο μοτίβο τριπεπτιδίου His-Pro-Asp (HPD), αλλά στη θέση του εντοπίζεται το τριπεπτίδιο HPE¹⁰⁵.

Όπως περιεγράφηκε, η συνέκφραση του γονιδίου *djlA* με το γονίδιο που κωδικοποιεί για την εκάστοτε διαμεμβρανική πρωτεΐνη στο στέλεχος SupotxD, έχει

ευεργετικό αντίκτυπο στην αντιμετώπιση της κυτταροτοξικότητας και την επιτυχή υπερέκφραση της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης. Παρόλο ότι οι λειτουργίες των DjlA, DnaJ και CbpA είναι μερικώς επικαλυπτόμενες¹⁰⁶, δείξαμε πρόσφατα πως η DjlA είναι η μοναδική από τις έξι J-πρωτεΐνες του *E. coli* με αυτές τις ιδιότητες στην υπερέκφραση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών¹⁰⁷, αν και, όπως έχει γίνει γνωστό, οι λειτουργίες των DjlA, DnaJ και CbpA είναι μερικώς επικαλυπτόμενες¹⁰⁶.

Η DjlA εντοπίζεται στην εσωτερική μεμβράνη του *E. coli* και αποτελείται από 3 λειτουργικά τμήματα: (i) Ένα αμινοτελικό (N-terminal) διαμεμβρανικό τμήμα (TMD) το οποίο μετέχει στο διμερισμό αυτής^{108, 109}, (ii) ένα κεντρικό τμήμα άγνωστης λειτουργίας¹⁰⁶ και (iii) ένα καρβοξυτελικό τμήμα (C-terminal) όπου και εδράζεται η J υπομονάδα^{97, 110, 111} (Σχήμα 13).



Σχήμα 13: Σχηματική απεικόνιση της δομής της πρωτεΐνης DjlA.

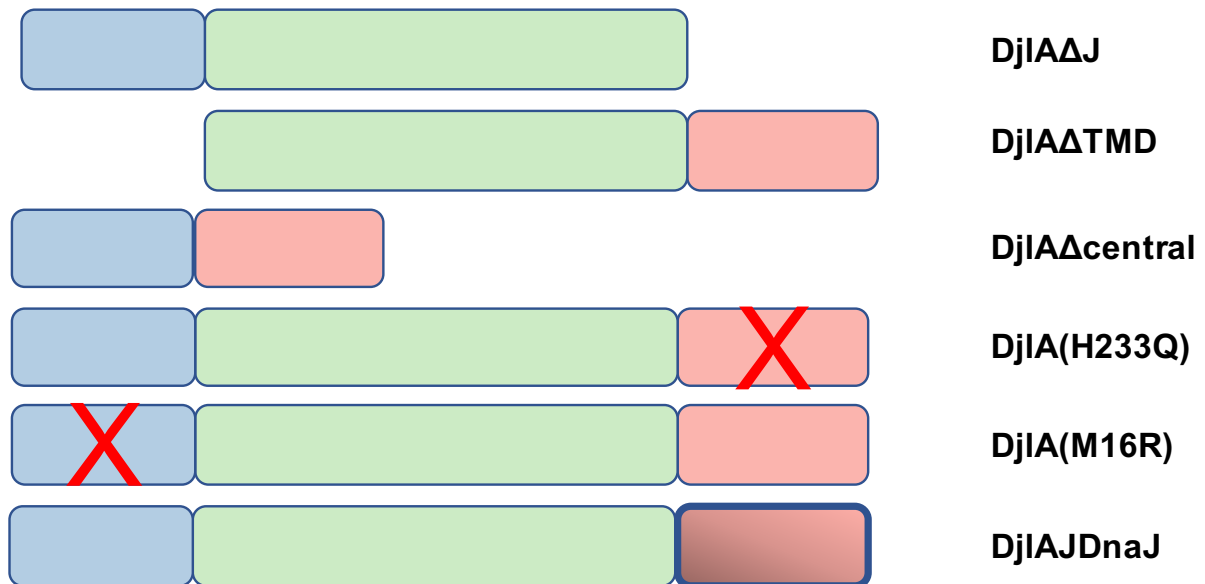
Στο αμινοτελικό της άκρο (N-terminus) εντοπίζεται η διαμεμβρανική υπομονάδα (TMD-Transmembrane domain), στο κέντρο της η κεντρική υπομονάδα άγνωστης λειτουργίας (Central domain) και στο καρβοξυτελικό της άκρο (C-terminus) η υπομονάδα J.

Η DjlA αποτελεί μία συν-μοριακό συνοδό της DnaK η οποία έχει βρεθεί πως κατά την υπερέκφρασή της, εκτός από την ευεργετικότερη δράση της στην υπερπαραγωγή διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, επάγει την αντίδραση στρες Res, ενεργοποιώντας την παραγωγή κολανικού οξέος και βοηθώντας πιθανώς στην επιβίωση των κυττάρων εκτός του ξενιστή, ή μετέχοντας στον σχηματισμό

βιοφίλμ^{111, 112}. Μεγάλο ενδιαφέρον προκαλεί η διαπίστωση πως η πρωτεΐνη DjIA έχει εντοπιστεί σε πολλούς αρνητικούς κατά Gram οργανισμούς κυρίως στα πρωτεοβακτήρια, και μάλιστα σε παθογόνα που προσβάλλουν τόσο φυτικούς οργανισμούς, όσο και τον άνθρωπο. Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη DjIA είναι απαραίτητη για την τοξικότητα του παθογόνου οργανισμού *Vibrio tapetis*¹¹³, καθώς και για την ικανότητα επιβίωσης και ανάπτυξης των οργανισμών *Legionella dumoffii* και *Legionella pneumophila*¹¹⁴.

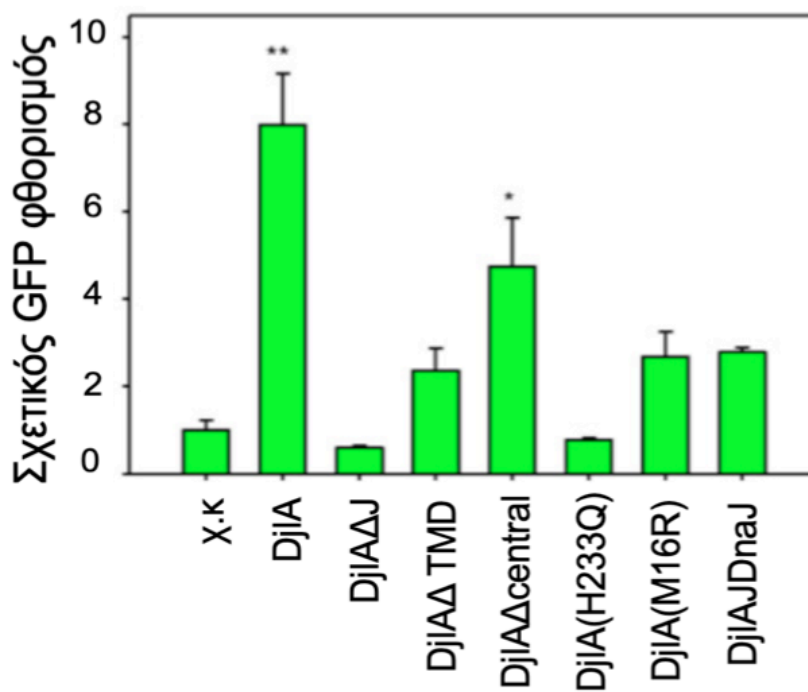
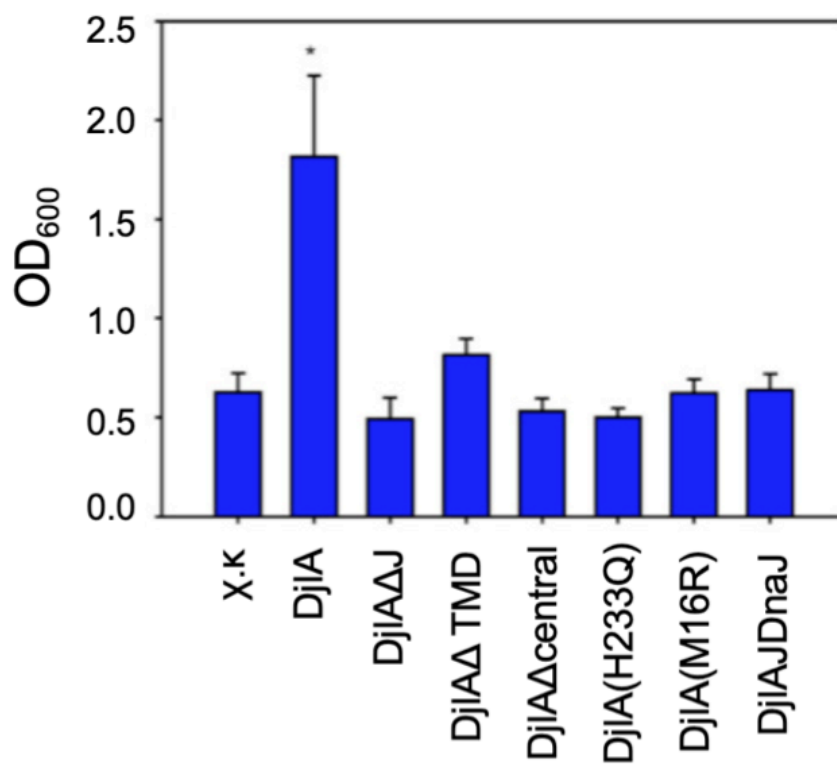
Μετά από τη δημιουργία παραλλαγών της DjIA (Σχήμα 14) και τη διεξαγωγή σειράς πειραμάτων, καταλήξαμε στα εξής συμπεράσματα: (i) η ύπαρξη ακέραιης της DjIA, πλήρους μήκους και συνδεδεμένης με τη μεμβράνη, είναι απαραίτητη προκειμένου να αντιμετωπιστεί η κυτταροτοξικότητα (Σχήμα 15), (ii) η λειτουργική αλληλεπίδραση με την DnaK οδηγεί σε επιτυχή υπερέκφραση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών (καθώς αποδείχθη πως ελλείψει της DnaK η υπερέκφραση μεμβρανοπρωτεϊνών στέφεται με πλήρη αποτυχία) (Σχήμα 16), (iii) η ύπαρξη μόνο μία λειτουργικής J υπομονάδας δεν αρκεί, όπως αποδείχθη από τα πειράματα με τις άλλες J πρωτεΐνες οι οποίες έφεραν κι αυτές λειτουργικές J υπομονάδες (Σχήμα 17)., (iv) η ευεργετική δράση της DjIA κατά την υπερέκφραση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών δεν πραγματοποιείται μέσω της ενεργοποίησης της αντίδρασης στρες Rcs, όπως πιστευόταν, καθώς αποδείχθη πως η ύπαρξη ή μη λειτουργικών RcsB ή RcsC^{110, 111} δεν έχει απολύτως κανένα αντίκτυπο στη διαδικασία της επιτυχούς υπερεκφράσεως μέσω της χρήσεως της DjIA¹⁰⁷ (Σχήμα 18), (v) το αμινοτελικό (N-terminal) διαμεμβρανικό τμήμα (TMD) δεν εξυπηρετεί απλά στο να βρίσκεται η DjIA στην εσωτερική μεμβράνη, αλλά κατέχει σημαντικό ρόλο κατά τη διαδικασία της υπερεκφράσεως διαμεμβρανικών πρωτεϊνών. Αξίζει να σημειωθεί σε αυτό το

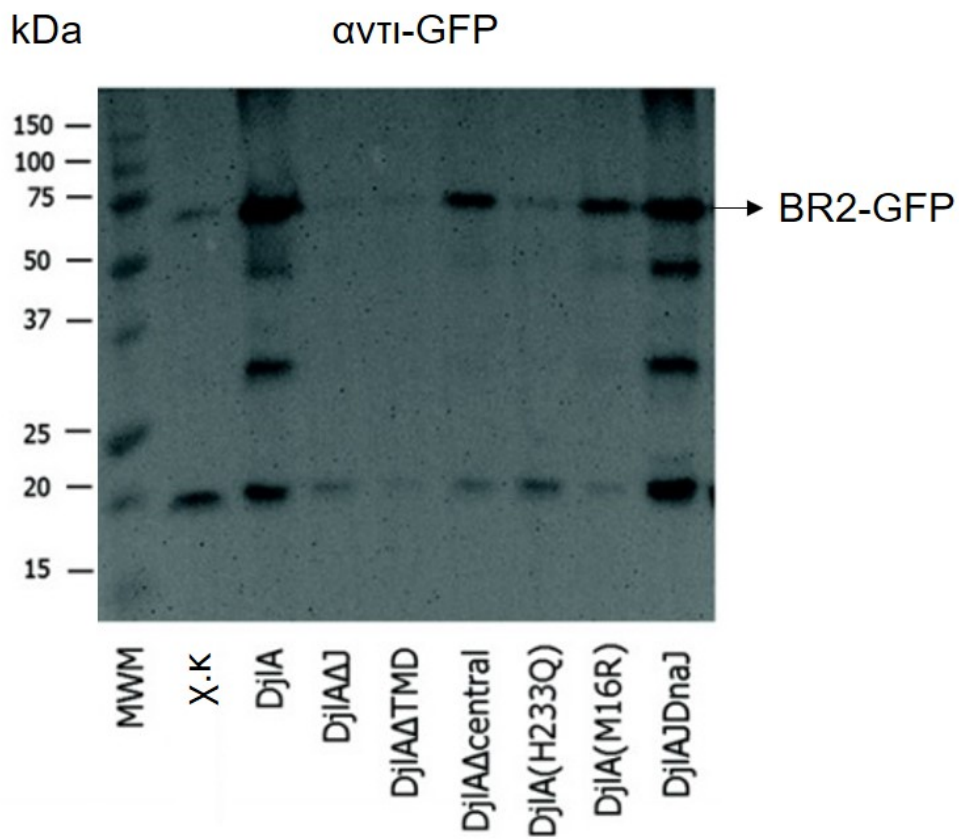
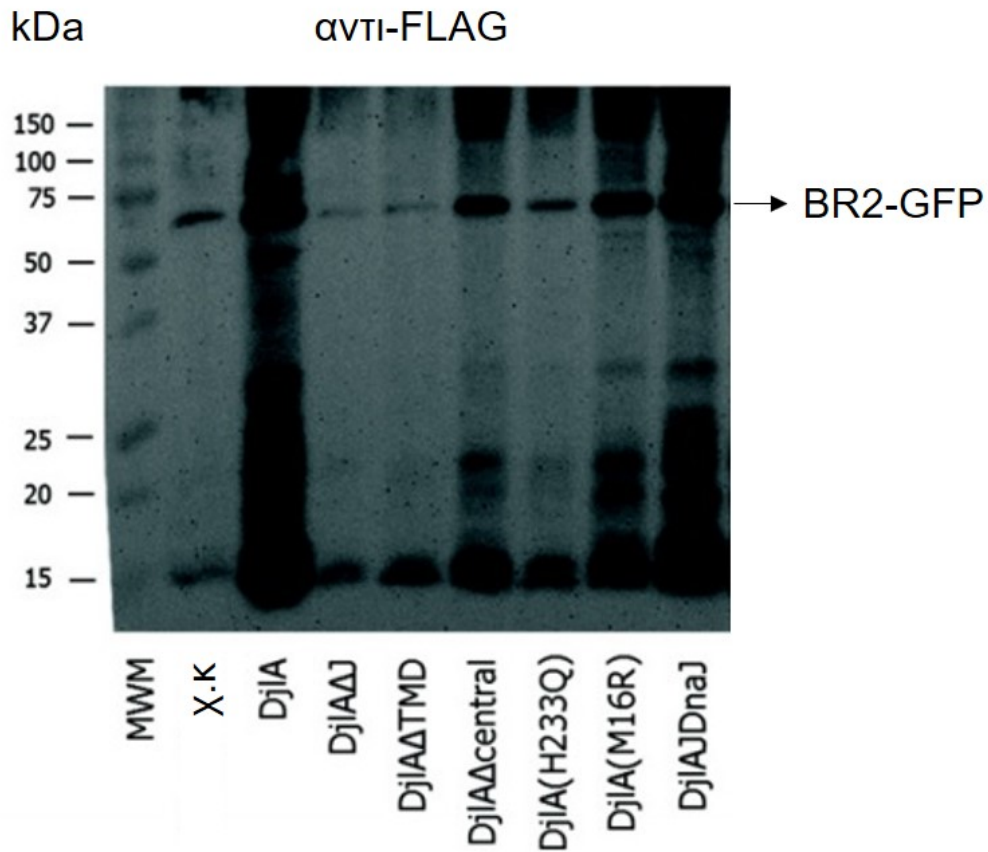
σημείο, πως το TMD της DjlA περιέχει ένα συντηρημένο μοτίβο GxxxG, το οποίο και εντοπίζεται και σε ομόλογες πρωτεΐνες άλλων παθογόνων μικροοργανισμών και έχει προταθεί πως ίσως βοηθά την DjlA κατά την αλληλεπίδρασή της με τις μεμβρανικές πρωτεΐνες^{108, 115}



Σχήμα 14: Σχηματική απεικόνιση των παραλλαγών της πρωτεΐνης DjlA

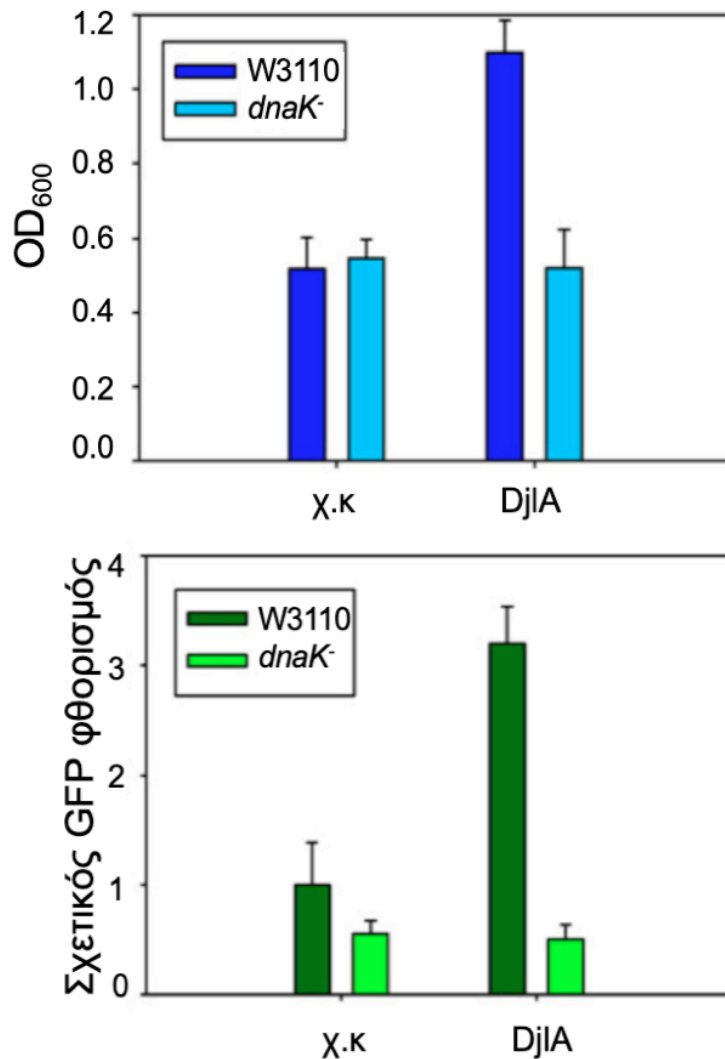
Οι παραλλαγές της πρωτεΐνης DjlA που χρησιμοποιήθηκαν είτε στερούνταν κάποια εκ των υπομονάδων τους (ΔJ), (ΔTMD), (Δcentral), είτε περιείχαν υποκατάσταση αμινοξέος σε κάποια εκ των υπομονάδων της πρωτεΐνης (H233Q, M16R), είτε χαρακτηρίζονταν από αντικατάσταση υπομονάδας με κάποια άλλη, όπως στην περίπτωση της παραλλαγής DjlAJDnaJ όπου η J υπομονάδα της DjlA έχει αντικατασταθεί από την αντίστοιχη J υπομονάδα της πρωτεΐνης DnaJ.





Σχήμα 15: Η ύπαρξη ακέραιης της *DjlA* κρίνεται απαραίτητη για την αντιμετώπιση της κυτταροτοξικότητας

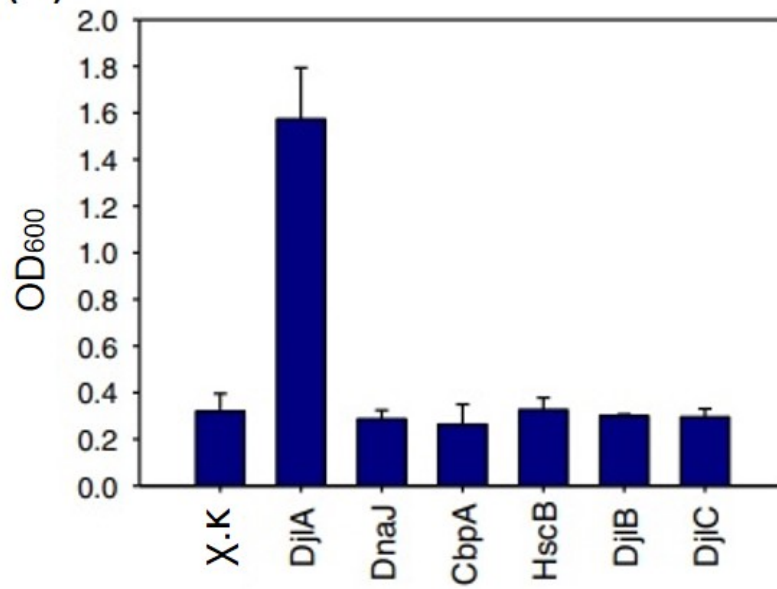
Μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 600nm (πάνω) και του σχετικού GFP φθορισμού (μέση), από ίσο όγκο καλλιέργειας όπου παράγεται η χιμαιρική πρωτεΐνη BR2-GFP από *E. coli* κύτταρα BW25113 *djlA*· μετά από προσθήκη 0.2 μg/mL aTc και 100*10⁻⁴ % w/v L (+) αραβινόζης, για 16 ώρες στους 25 °C χωρίς ή με τη συνέκφραση του γονιδίου *djlA* και των διαφορετικών παραλλαγών του. Οι μετρήσεις έχουν πραγματοποιηθεί σε τριπλές καλλιέργειες, τουλάχιστον 3 ανεξάρτητες φορές και τα σφάλματα αντιπροσωπεύουν μία τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή (± s.e.m.). Η στατιστική σημαντικότητα αναφέρεται στις διαφορές συγκριτικά με τα δείγματα όπου δεν έχει χρησιμοποιηθεί καταστολέας, και οποιαδήποτε άλλη σύγκριση σημαίνεται με μία μπάρα μεταξύ των δειγμάτων που συγκρίνονται. (Κάτω) Ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες, και ανοσοαποτύπωση κατά Western απομονωμένων ολικών μεμβρανών από κύτταρα MC1061 που δεν περιέχουν καταστολέα κι από κύτταρα χωρίς ή με τη συνέκφραση του γονιδίου *djlA* και των διαφορετικών παραλλαγών του, τα παράγουν τη χιμαιρική πρωτεΐνη BR2-GFP, χρησιμοποιώντας το αντίσωμα αντι-FLAG που στοχεύει στο N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης, ή το αντίσωμα αντι-GFP που στοχεύει στο C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης, σε δείγματα όπου έχει προηγηθεί βρασμό. Τα παραπάνω πειράματα διεξήχθησαν από τη Δρ. Δήμητρα Γιαλαμά και την υποψήφια διδάκτορα Μυρσίνη Μίχου. Προσαρμοσμένο σχήμα από Gialama et al.¹⁰⁷



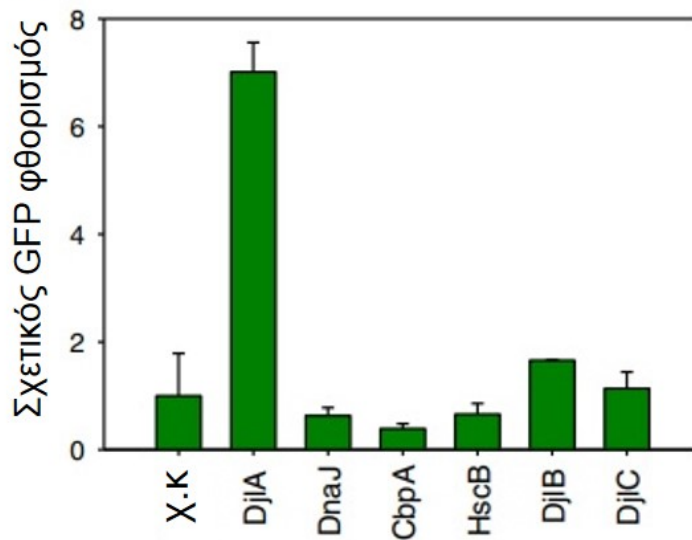
Σχήμα 16: Η επιτυχής αλληλεπίδραση της DjIA με την DnaK οδηγεί σε επιτυχή υπερέκφραση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών.

Μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 600nm (πάνω) και του σχετικού GFP φθορισμού (κάτω), από ίσο όγκο καλλιέργειας όπου παράγεται η χιμαιρική πρωτεΐνη BR2-GFP από *E. coli* κύτταρα W3110 ή W3110 *dnaK*⁻ μετά από προσθήκη 0.2 μg/mL aTc και 100*10⁻⁴ % w/v L (+) αραβινόζης, για 16 ώρες στους 25 °C χωρίς ή με τη συνέκφραση του γονιδίου *djlA*. Οι μετρήσεις έχουν πραγματοποιηθεί σε τριπλές καλλιέργειες, τουλάχιστον 3 ανεξάρτητες φορές και τα σφάλματα αντιπροσωπεύουν μία τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή (± s.e.m.). Τα παραπάνω πειράματα διεξήχθησαν από τη Δρ. Δήμητρα Γιαλαμά. Προσαρμοσμένο σχήμα από Gialama et al.¹⁰⁷

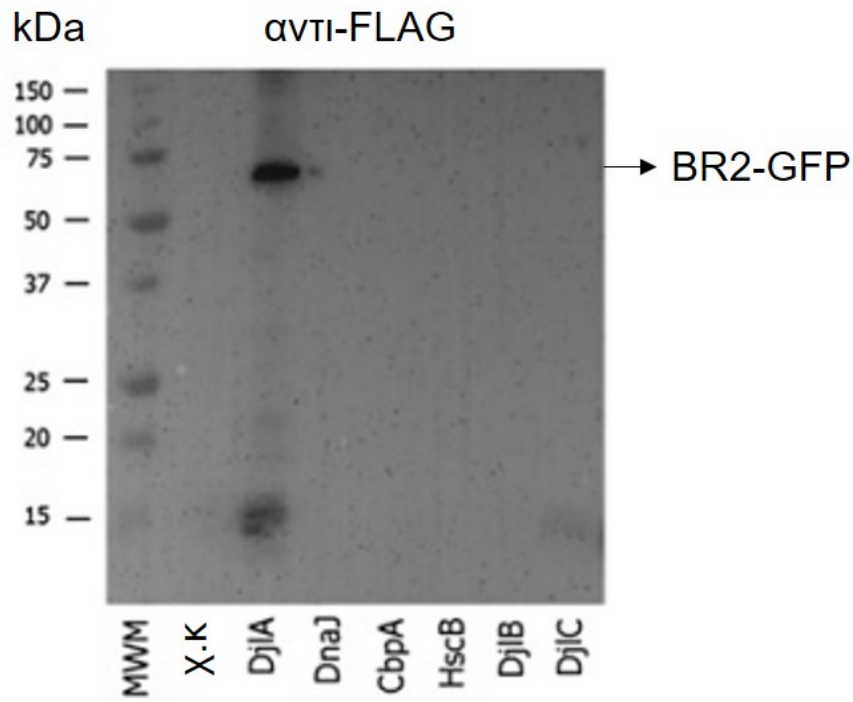
(α)



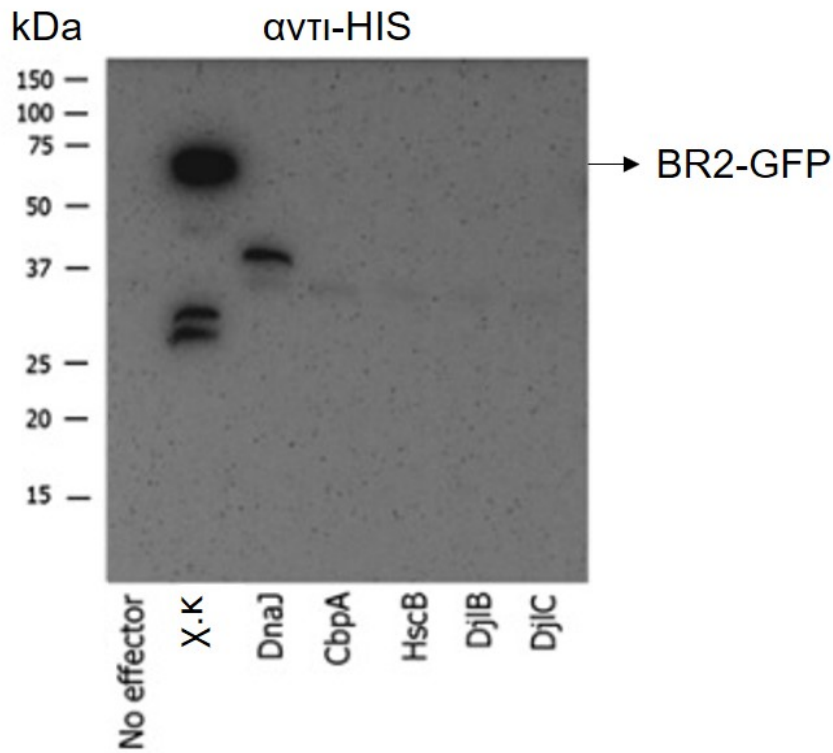
(β)



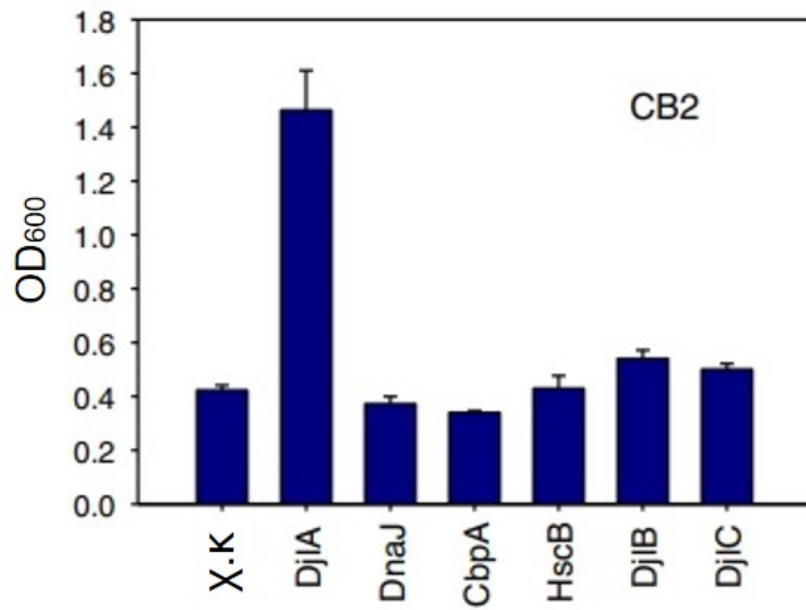
(γ)



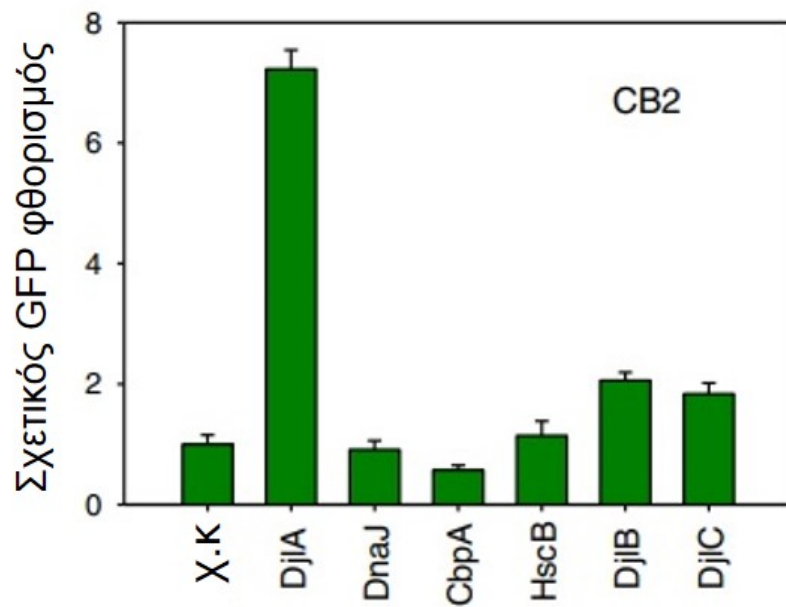
(δ)

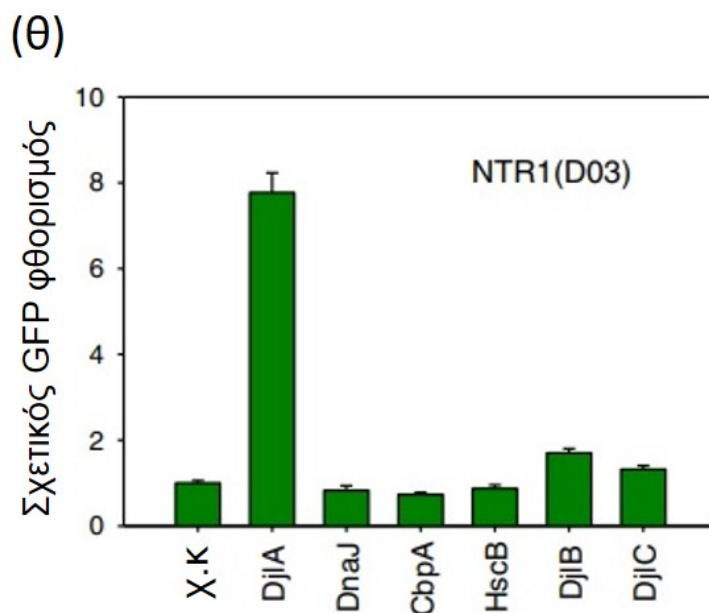
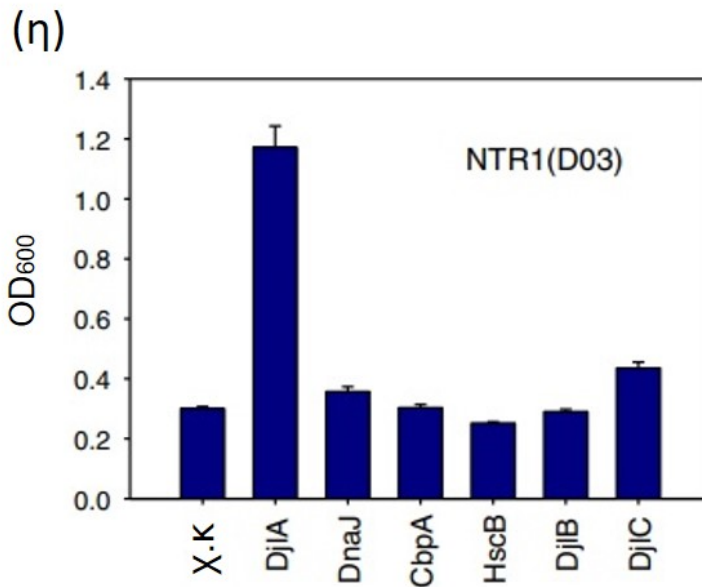


(ε)



(ζ)

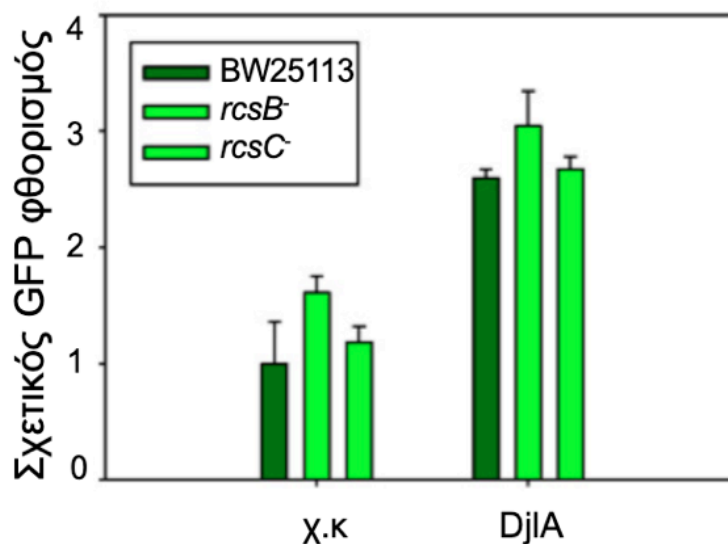
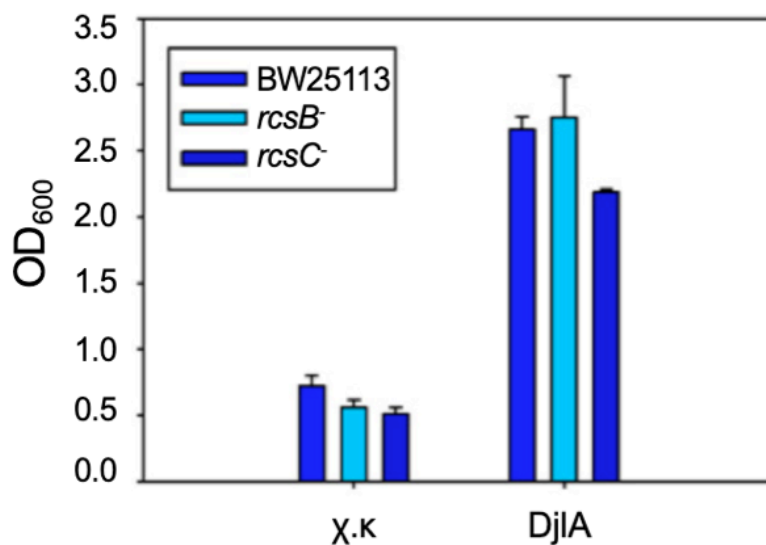




Σχήμα 17: Η DjIA είναι η μοναδική J-πρωτεΐνη με ευεργετικές ιδιότητες στην αντιμετώπιση της κυτταροτοξικότητας και στην επιτυχή υπερέκφραση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών .

(α) Μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 600nm και (β) του σχετικού GFP φθορισμού (μέση), δειγμάτων που προέρχονται από ίσο αριθμό κυττάρων όπου παράγεται η χιμαιρική πρωτεΐνη BR2-GFP από *E. coli* κύτταρα MC1061 μετά από προσθήκη 0.2 μg/mL aTc και 100*10⁻⁴ % w/v L (+) αραβινόζης, για 16 ώρες στους 25 °C χωρίς ή με τη συμπαραγωγή άλλων J-πρωτεϊνών. Οι μετρήσεις έχουν

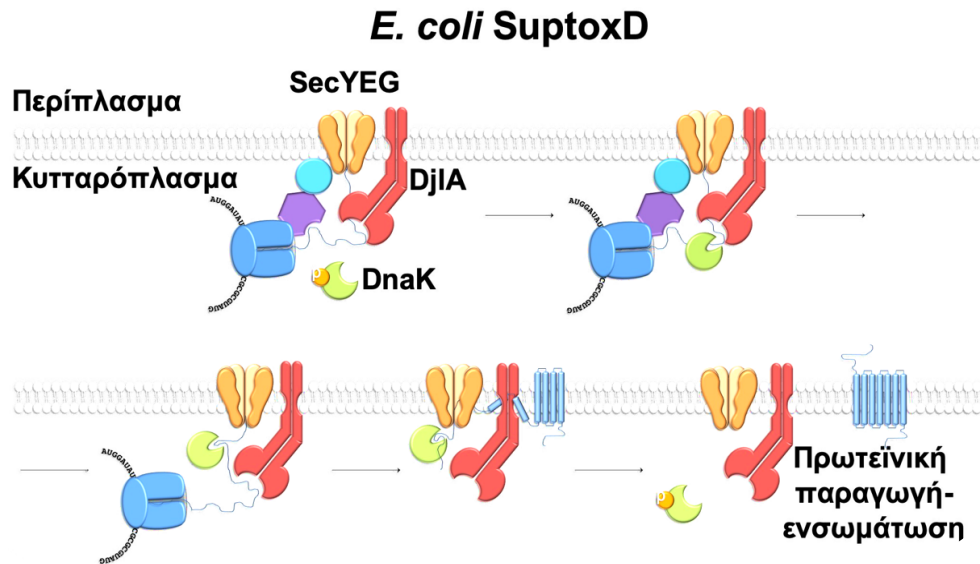
πραγματοποιηθεί σε τριπλές καλλιέργειες, τουλάχιστον 3 ανεξάρτητες φορές και τα σφάλματα αντιπροσωπεύουν μία τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή (\pm s.e.m.). . (γ)(δ)Ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες, και ανοσοαποτύπωση κατά Western απομονωμένων ολικών μεμβρανών από κύτταρα MC1061 που δεν περιέχουν καταστολέα κι από κύτταρα χωρίς ή με τη συμπαραγωγή άλλων J-πρωτεΐνων, τα παράγουν τη χιμαιρική πρωτεΐνη BR2-GFP, χρησιμοποιώντας το αντίσωμα αντι-FLAG που στοχεύει στο N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης, ή το αντίσωμα αντι-HIS που στοχεύει στο C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης, σε δείγματα όπου έχει προηγηθεί βρασμό (ε)(ζ) Το ίδιο όπως για (α)(β) για τη χιμαιρική πρωτεΐνη CB2-GFP (η)(θ) Το ίδιο όπως για (α)(β) για τη χιμαιρική πρωτεΐνη D03-GFP. . Τα παραπάνω πειράματα διεξήχθησαν από τη Δρ. Δήμητρα Γιαλαμά και την υποψήφια διδάκτορα Μυρσίνη Μίχου. Προσαρμοσμένο σχήμα από Gialama et al.¹⁰⁷



Σχήμα 18: Οι ευεργετικές ιδιότητες της DjlA κατά την υπερέκφραση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών δεν πραγματοποιείται μέσω της ενεργοποίησης της αντίδρασης στρες Rcs.

Μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 600nm (πάνω) και του σχετικού GFP φθορισμού (κάτω), από ίσο όγκο καλλιέργειας όπου παράγεται η χιμαιρική πρωτεΐνη BR2-GFP από *E. coli* κύτταρα BW25113, BW25113 *rscB* ή BW25113 *rscC* μετά από προσθήκη 0.2 μg/mL aTc και 100*10⁻⁴ % w/v L (+) αραβινόζης, για 16 ώρες στους 25 °C. Οι μετρήσεις έχουν πραγματοποιηθεί σε τριπλές καλλιέργειες, τουλάχιστον 3 ανεξάρτητες φορές και τα σφάλματα αντιπροσωπεύουν μία τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή (± s.e.m.). Τα παραπάνω πειράματα διεξήχθησαν από τη Δρ. Δήμητρα Γιαλαμά. Προσαρμοσμένο σχήμα από Gialama et al.¹⁰⁷

Με βάση τα παραπάνω, προτείνουμε το εξής μοντέλο δράσης της πρωτεΐνης DjlA: Αρχικά η J υπομονάδα της DjlA αναγνωρίζει και συνδέεται με τη νεοσύστατη πολυπεπτιδική αλυσίδα της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης καθώς αυτή εξέρχεται από το ριβόσωμα. Εν συνεχεία, η DjlA την παρουσιάζει στην DnaK, διεγείρει την ενεργότητα της ATPάσης της DnaK προκαλώντας αλλαγές στη διαμόρφωση της DnaK, επιτρέποντας έτσι την ένωση της νεοσύστατης πολυπεπτιδικής αλυσίδας της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης με την DnaK. Τελικώς, μέσω του διαμεμβρανικού της τμήματος, η DjlA αλληλεπιδρά με τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη και τη βοηθά να ενσωματωθεί στη μεμβράνη, μέσω της δράσης της DnaK. Πιστεύουμε πως η ευεργετική δράση της πρωτεΐνης DjlA στην καταστολή της κυτταροτοξικότητας πραγματοποιείται κατά το τελευταίο στάδιο της ένταξης της νέας πρωτεΐνης στη μεμβράνη, καθώς επίσης πως τα αυξημένα επίπεδα παραγωγής διαμεμβρανικής πρωτεΐνης προκύπτουν από τις ιδιότητες της επιτυχούς δράσης του συμπλόκου DjlA-DnaK (Σχήμα 19).



Σχήμα 19: Πιθανό μοντέλο δράσης της πρωτεΐνης DjlA

Αρχικά η J υπομονάδα της DjlA εντοπίζει και συνδέεται με τη νεοσύστατη πολυπεπτιδική αλυσίδα της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης καθώς αυτή εξέρχεται από το ριβόσωμα. Εν συνεχεία, η DjlA την παρουσιάζει στην DnaK, διεγείρει την ενεργότητα της ΑΤΡάσης της DnaK προκαλώντας αλλαγές στη διαμόρφωση της DnaK, επιτρέποντας έτσι την ένωση της νεοσύστατης πολυπεπτιδικής αλυσίδας της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης με την DnaK. Τελικώς, μέσω του διαμεμβρανικού της τμήματος, η DjlA αλληλεπιδρά με τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη και τη βοηθά να ενσωματωθεί στη μεμβράνη, μέσω της δράσης της DnaK.

3.3.2 RraA: μία πρωτεΐνη-ρυθμιστής με ιδιαίτερο ενδιαφέρον

Η πρωτεΐνη RraA (Regulator of ribonuclease activity A) ρυθμίζει το ρυθμό της αποδομητικής δράσης ποικίλων mRNA από την RNAάση E¹¹⁶. Έχει βρεθεί πως κατά την υπερπαραγωγή της πρωτεΐνης RraA επηρεάζονται τα επίπεδα τουλάχιστον 2000 διαφορετικών mRNA στον οργανισμό *E. coli*, τα οποία βρέθηκε πως κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση του κυτταρικού φακέλου ή στον αναερόβιο μεταβολισμό¹¹⁷. In vitro, η RraA δεν αναστέλλει τη δράση της RNAάσης E άμεσα, αλλά φαίνεται πως δρα εμμέσως, εμποδίζοντας την πρόσδεση RNA μορίων στο καρβοξυτελικό τμήμα (C-terminal) της RNAάσης E¹¹⁶.

Η RNAάση E, πρωτεΐνη απαραίτητη για την επιβίωση του *E. coli*¹¹⁸, αποτελείται από ένα αμινοτελικό (N-terminal) καταλυτικό τμήμα κι ένα καρβοξυτελικό τμήμα (C-terminal)^{118, 119} που, όπως προαναφέρθηκε, είναι και αυτό στο οποίο προσδένονται διάφορες πρωτεΐνες όπως η RraA και η RraB^{120, 121}. Το καρβοξυτελικό τμήμα είναι επίσης υπεύθυνο για τη σύνθεση του RNA degradosome, το οποίο αποτελείται, εκτός από την RNAάση E, από μία εξωριβονουκλεάση (PNPase 3'→5'), τη DEAD-box RhlB RNA ελικάση και το ένζυμο ενολάση¹²²⁻¹²⁴. Με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου έγινε γνωστό πως το RNA degradosome υφίσταται in vivo και μάλιστα, εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, μέσω προσδέσεως του αμινοτελικού (N-terminal) τμήματος της RNAάσης E¹²⁵.

Όπως περιεγράφηκε, η συνέκφραση του γονιδίου *rraA* έχει την ικανότητα να αντιμετωπίζει την επαγόμενη κυτταροτοξικότητα και να βελτιώνει σημαντικά την υπερέκφραση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών⁹⁰. Προκειμένου να διερευνηθεί ο τρόπος με τον οποίο η RraA εμπλέκεται στη διαδικασία πρωτεϊνικής παραγωγής, καθώς

επίσης και η σχέση RraA και RNAάσης E, προβήκαμε στη μελέτη στελεχών *E. coli* τα οποία έφεραν μεταλλάξεις στο γονίδιο *rne* το οποίο κωδικοποιεί για την RNAάση E. Οι μεταλλάξεις αυτές έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία παραλλαγών, καθεμία εκ των οποίων στερείται κι ενός, μικρού ή μεγαλύτερου, τμήματος στο καρβοξυτελικό άκρο (C-terminal) της πρωτεΐνης¹²⁶. Καθώς το αμινοτελικό (N-terminal) άκρο είναι απαραίτητο για την καταλυτική δράση της πρωτεΐνης, μεταλλαγμένα στελέχη που στερούνται ολόκληρο ή τμήματα αυτού του άκρου δεν υφίστανται. Μετά την διεξαγωγή σειράς πειραμάτων, καταλήξαμε στα εξής συμπεράσματα: (i) η επιτυχής υπερπαραγωγή μεμβρανοπρωτεϊνών, μέσω της δράσης της RraA, είχε ελαττωθεί σημαντικά ή είχε εξαλειφθεί στη πλειοψηφία των εξεταζόμενων παραλλαγών (ii) η επωφελής δράση της RraA επιτελείται μέσω της επιτυχούς αλληλεπίδρασης της με την RNAάση E (κι όχι μέσω αλληλεπίδρασης με άλλες ριβονουκλεάσες, όπως η RNAάση G), παρεμποδίζοντας τη ριβονουκλεολυτική της δράση κατά την υπερπαραγωγή της RraA (iii) η RraA είναι ο μοναδικός αναστολέας της δράσης της RNAάσης E με ευεργετικές ιδιότητες στην υπερπαραγωγή διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, μετά από πειράματα που διεξάχθηκαν με την RraB.

Από αυτά τα συμπεράσματα, μπορούμε να υποθέσουμε πως η RraA καταστέλλει την κυτταροτοξικότητα και προάγει την επιτυχή υπερπαραγωγή μίας διαμεμβρανικής πρωτεΐνης, όχι με το να αλληλεπιδρά άμεσα με την πρωτεΐνη αυτή (ή με το mRNA της, καθώς τα επίπεδα μεταγραφής δε διαφοροποιούνται παρουσία ή μη της RraA), αλλά εμμέσως. Συγκεκριμένα, εικάζεται πως η RraA σταθεροποιεί, μέσω της δράσης της, το mRNA και αυξάνει σημαντικά την ποσότητα άλλων

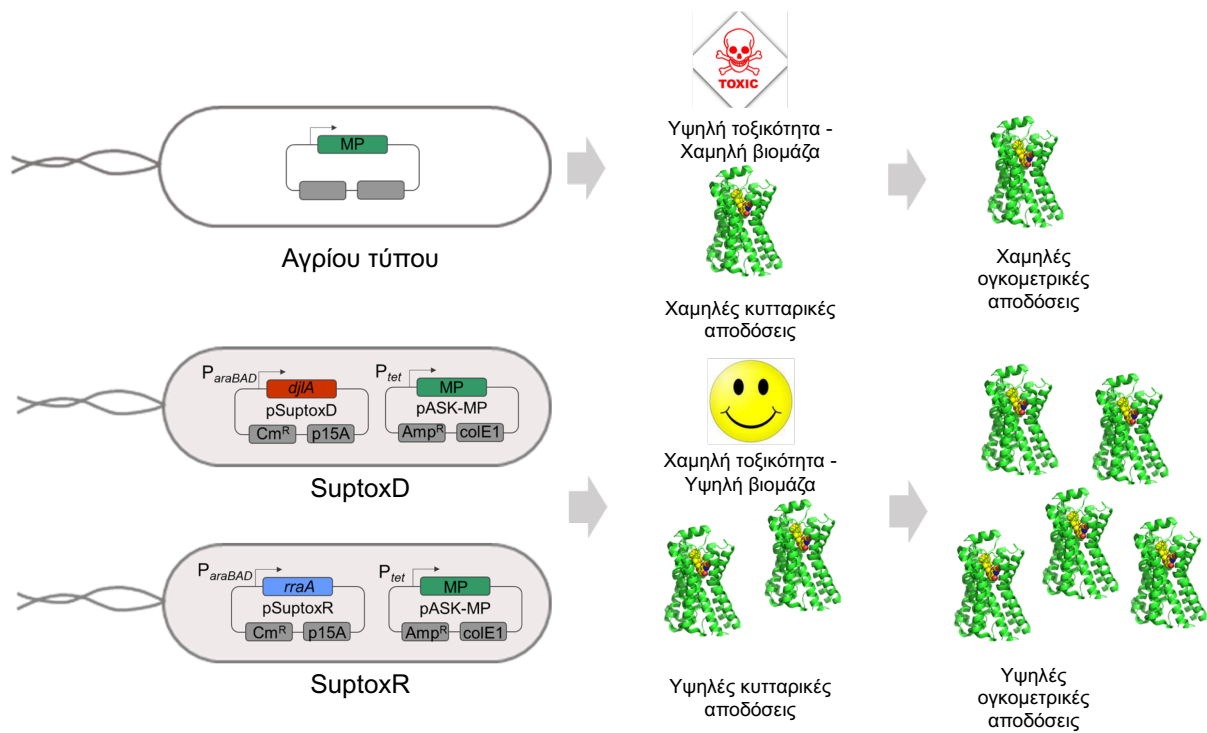
παραγόντων, οι οποίοι πιθανότατα εμπλέκονται στη βιοσύνθεση του κυτταρικού φακέλου ή/και στον αναερόβιο μεταβολισμό.

Μία εναλλακτική υπόθεση για τη δράση της RraA είναι η εξής: καθώς, όπως προαναφέρθηκε, η RNAάση E και το RNA degradosome εντοπίζονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, τότε υπάρχει περίπτωση η RraA να μεσολαβεί στην αλληλεπίδραση του mRNA της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης με την RNAάση E, κι έτσι να δρα ως βοηθητικός παράγοντας στην τελική βιογένεση της μεμβρανοπρωτεΐνης μέσω συν-μεταφραστικού τρόπου .

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί η διαπίστωση πως, μετά την διεξαγωγή των κατάλληλων πειραμάτων, ο μηχανισμός δράσης των γονιδίων *djlA* και *rraA* είναι εντελώς διαφορετικός κατά την υπερπαραγωγή διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, και επιπλέον, πως η δράση τους δεν είναι αθροιστική¹⁰⁷. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός πως κοινοί παράγοντες που εμπλέκονται και στους δύο μηχανισμούς δεν έχουν την ικανότητα να τους βοηθήσουν ταυτοχρόνως. Μία άλλη υπόθεση που πιθανώς εξηγεί το συγκεκριμένο φαινόμενο είναι η εξής: τα δύο γονίδια, *djlA* και *rraA*, μεταγράφονται σε ένα κοινό mRNA, με τη *djlA* να εντοπίζεται στο 5' άκρο του μορίου. Έτσι, η μετάφραση του γονιδίου *rraA*, από ένα μόριο mRNA το οποίο στερείται ελεύθερου 5' άκρου, ίσως επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την παραγωγή της πρωτεΐνης RraA, και πιθανώς και την τοπολογία της στο κύτταρο.

Κεφάλαιο 4 - Βελτιστοποίηση συνθηκών υπερέκφρασης διαμεμβρανικών πρωτεϊνών στα στελέχη SuptoxD και SuptoxR

Τα στελέχη SuptoxD και SuptoxR φέρουν έκαστο ένα πλασμίδιο, pSuptoxD ή pSuptoxR, τα οποία και εμπεριέχουν τα γονίδια *djlA* και *rraA* αντίστοιχα. Η υπερέκφραση των πλασμιδίων αυτών πραγματοποιείται υπό την καθοδήγηση του *araBAD* υποκινητή και του επαγωγέα του, της L(+) αραβινόζης¹²⁷. Η εκάστοτε διαμεμβρανική πρωτεΐνη βρίσκεται συνήθως κλωνοποιημένη στον πλασμιδιακό φορέα pASK75, υπό τον έλεγχο του *tet* υποκινητή και η έκφραση της επάγεται από το μόριο ανυδροτετρακυκλίνη¹²⁸ (Σχήμα 20). Αξιζει να σημειωθεί πως η επιτυχής έκφραση μεμβρανοπρωτεϊνών στα στελέχη SuptoxD και SuptoxR έχει αποδειχθεί, σε προηγούμενες μελέτες, πως δεν εξαρτάται από την επιλογή των συγκεκριμένων υποκινητών, αλλά μπορεί να επιτευχθεί και με διαφορετικό συνδυασμό πλασμιδιακών φορέων-υποκινητών^{90, 110}.



Σχήμα 20: Χαρακτηριστικά των στελεχών SuptoxD και SuptoxR.

Οι ευεργετικές ιδιότητες που κατέχουν τα στελέχη αυτά στην αντιμετώπιση της κυτταροτοξικότητας και στην επιτυχή υπερπαραγωγή διαμεμβρανικών πρωτεϊνών σε υψηλή απόδοση βασίζονται στη συνέκφραση των πλασμιδίων pSuptoxD και pSuptoxR, τα οποία και εμπεριέχουν τα γονίδια *djlA* και *rraA* αντίστοιχα, υπό τον έλεγχο του *araBAD* υποκινητή. Η έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν για μεμβρανικές πρωτεΐνες ελέγχεται από τον *tet* υποκινητή. Προσαρμοσμένο σχήμα από Michou et al.¹²⁹

4.1 Βελτιστοποίηση της παραγωγικότητας των στελεχών SuptoxD και SuptoxR σε ανασυνδυασμένες μεμβρανοπρωτεΐνες ρυθμίζοντας τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων-καταστολέων *djlA* και *rraA*

Το βασικό χαρακτηριστικό των στελεχών SuptoxD και SuptoxR αποτελεί, όπως προαναφέρθηκε, η υπερπαραγωγή των πρωτεϊνών του βακτηρίου *E. coli* DjlA και RraA αντίστοιχα. Η υπερπαραγωγή των πρωτεϊνών αυτών πραγματοποιείται με την προσθήκη του επαγωγέα L(+) αραβινόζης στο θρεπτικό μέσο των βακτηριακών κυττάρων⁹⁰. Αποσκοπώντας στο να αξιολογήσουμε τη σχέση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων-καταστολέων *djlA* και *rraA* και των επιπέδων υπερπαραγωγής ανασυνδυασμένων διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, δοκιμάσαμε ένα εύρος διαφορετικών συγκεντρώσεων L(+) αραβινόζης.

Για το SuptoxD, επιλέξαμε να υπερεκφράσουμε δύο GPCRs από θηλαστικά με μεγάλο φαρμακευτικό ενδιαφέρον: τη BR2 και τον τροποποιημένο υποδοχέα της νευροτενοΐνης 1((D03)) από τον αρουραίο (πίνακας 1, Κεφάλαιο 8). Για την εύκολη παρακολούθηση της πρωτεϊνικής παραγωγής, οι πρωτεΐνες αυτές ήταν χιμαιρικές καθώς βρίσκονταν συζευγμένες με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) στο καρβοξυτελικό τους άκρο (C terminus). Η επιλογή χρήσης των χιμαιρικών αυτών κατασκευών βασίστηκε στο γεγονός πως ο φθορισμός που ανιχνεύεται σε μία καλλιέργεια *E. coli* κύτταρα που εκφράζουν μία τέτοια πρωτεΐνη έχει αποδειχθεί πως συσχετίζεται άμεσα με την ποσότητα της πρωτεΐνης που παράγεται και ενσωματώνεται στη μεμβράνη. Τέλος, οι πρωτεΐνες έφεραν κι έναν επίτοπο ιστιδίνης (8xHIS) στο καρβοξυτελικό τους άκρο (C-terminus), καθώς κι έναν επίτοπο FLAG

στο αμινοτελικό τους άκρο (N-terminus) για τον ανοσοεπιτοπισμό και την απομόνωσή τους.

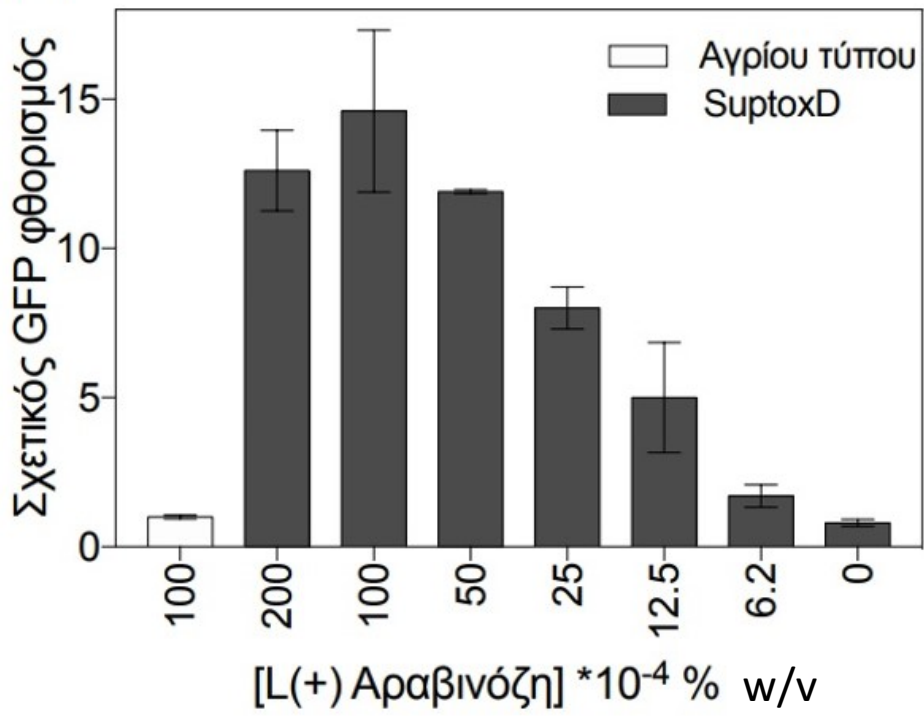
Έτσι, εξετάστηκε η υπερπαραγωγή των πρωτεϊνών BR2 και NTR1(D03), ρυθμίζοντας τα επίπεδα έκφρασης της *djlA*, με την προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων L(+) αραβινόζης στις βακτηριακές καλλιέργειες, οι οποίες κυμαίνονταν μεταξύ 0-0.02% w/v. Όπως φαίνεται και στο σχήμα 24, μετρώντας τον παραγόμενο φθορισμό από κύτταρα SuptoxD που προέρχονται από ίσο όγκο καλλιέργειας και συγκρίνοντας πάντα με τη καλλιέργεια-μάρτυρα, όπου δεν παράγεται η πρωτεΐνη DjlA αλλά μόνο η διαμεμβρανική πρωτεΐνη BR2-GFP ή NTR1(D03)-GFP από κύτταρα αγρίου τύπου, γίνεται αντιληπτό πως η προσθήκη L(+) αραβινόζης μεταξύ 25-200*10⁻⁴% w/v οδηγεί σε υψηλή παραγωγή των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών BR2-GFP (Σχήμα 21α) και NTR1(D03)-GFP (Σχήμα 21β). Όπως δηλώνουν και οι μετρήσεις, η βέλτιστη συγκέντρωση L(+) αραβινόζης προσδιορίστηκε στο 100*10⁻⁴ % w/v.

Η υπόθεση πως ο αυξημένος κυτταρικός φθορισμός που παρατηρήθηκε οφείλεται σε αυξημένη παραγωγή πλήρους μήκους, σωστά ενσωματωμένης και αναδιπλωμένης διαμεμβρανικής πρωτεΐνης, επιβεβαιώθηκε με τη διεξαγωγή επιπλέον πειραμάτων. Σε αυτά, απομονώθηκε το συνολικό κλάσμα κυτταρικών μεμβρανών από καλλιέργεια-μάρτυρα με κύτταρα αγρίου τύπου (απουσία υπερέκφρασης *djlA*) και από κύτταρα SuptoxD που είχαν χρησιμοποιηθεί για την υπερέκφραση της μεμβρανοπρωτεΐνης NTR1(D03), η οποία βρισκόταν σε χιμαιρική κατασκευή με τη βελτιωμένη πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (Enhanced Green Fluorescent Protein, EGFP). Μετά την απομόνωση των μεμβρανών αυτών, πραγματοποιήθηκε ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές

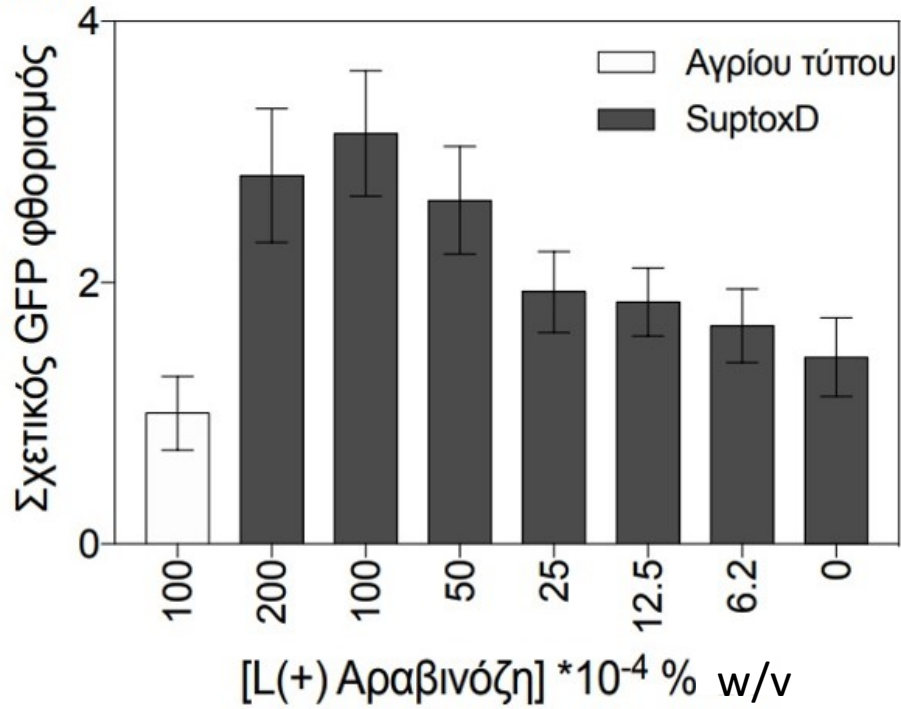
συνθήκες, ανάλυση ενδοπηκτικού φθορισμού (in-gel fluorescence), καθώς και ανάλυση μετά από ανοσοαποτύπωση κατά western.

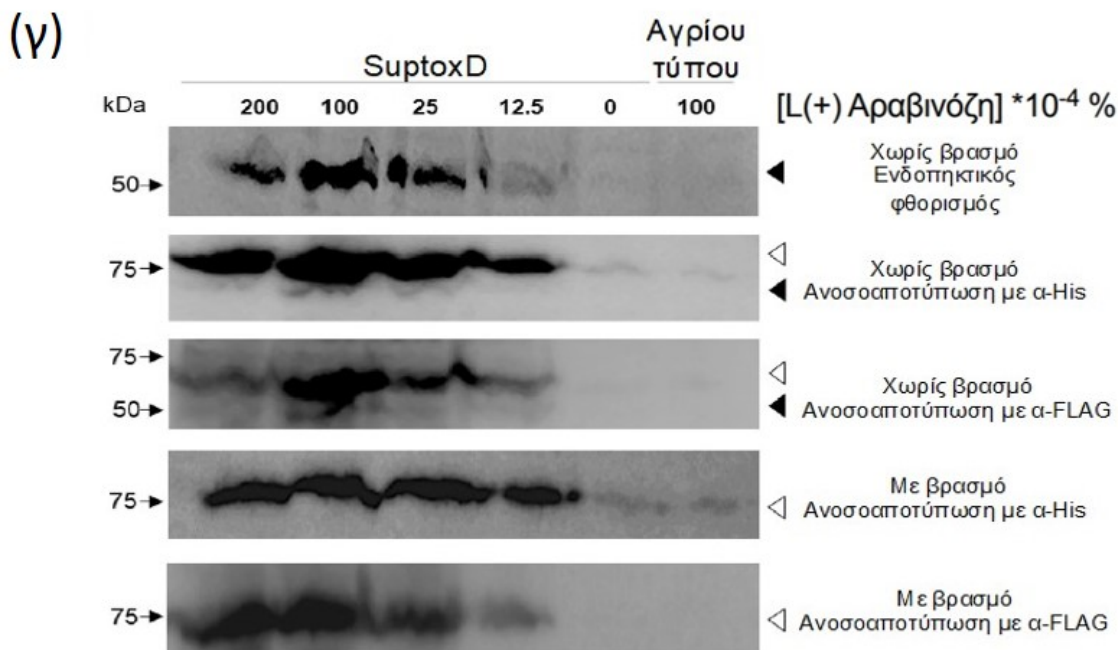
Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, η χρήση της χημιακής κατασκευής διαμεμβρανικής πρωτεΐνης- GFP μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του ποσοστού της σωστά αναδιπλωμένης και ενσωματωμένης στη μεμβράνη πρωτεΐνης από την ολικά παραγόμενη διαμεμβρανική πρωτεΐνη¹³⁰. Συγκεκριμένα, κατά την ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό ημι-αποδιατακτικές συνθήκες (χωρίς βρασμό των δειγμάτων), διακρίνονται δύο πρωτεϊνικές ζώνες: μία μη-φθορίζουσα (άνω ζώνη) και μία φθορίζουσα (κάτω ζώνη). Η μη-φθορίζουσα ζώνη αντιστοιχεί στη λανθασμένα αναδιπλωμένη πρωτεΐνη, ενώ η φθορίζουσα, που διατρέχει και πιο γρήγορα την πηκτή πολυακρυλαμιδίου, τη σωστά αναδιπλωμένη πρωτεΐνη. Με την ανάλυση ενδοπηκτικού φθορισμού, μπορεί να ανιχνευτεί η φθορίζουσα μόνο ζώνη, ενώ με την ανάλυση μετά από ανοσοαποτύπωση κατά western, και τη χρήση των αντίστοιχων, με τους επίτοπους που φέρει η πρωτεΐνη, αντισωμάτων ανιχνεύονται και οι δύο ζώνες, οι οποίες είναι πλήρους μήκους. Εάν πριν την ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου προηγηθεί βρασμός της πρωτεΐνης, τότε αυτή οδηγείται σε πλήρη μετουσίωση και τελικώς στη δημιουργία μίας μόνο ζώνης, μη φθορίζουσας, η οποία από άποψη μοριακού μεγέθους, εντοπίζεται στο ίδιο ακριβώς μέγεθος όπως και η προτέρα μη-φθορίζουσα ζώνη όταν το δείγμα δεν έχει υποστεί βρασμό.

(α)



(β)





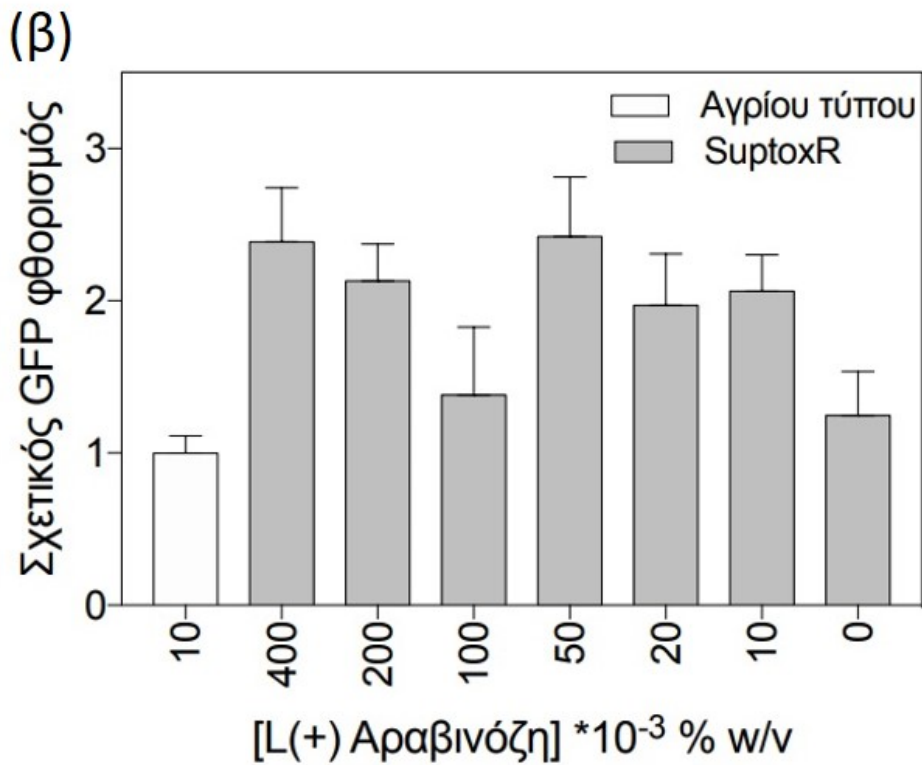
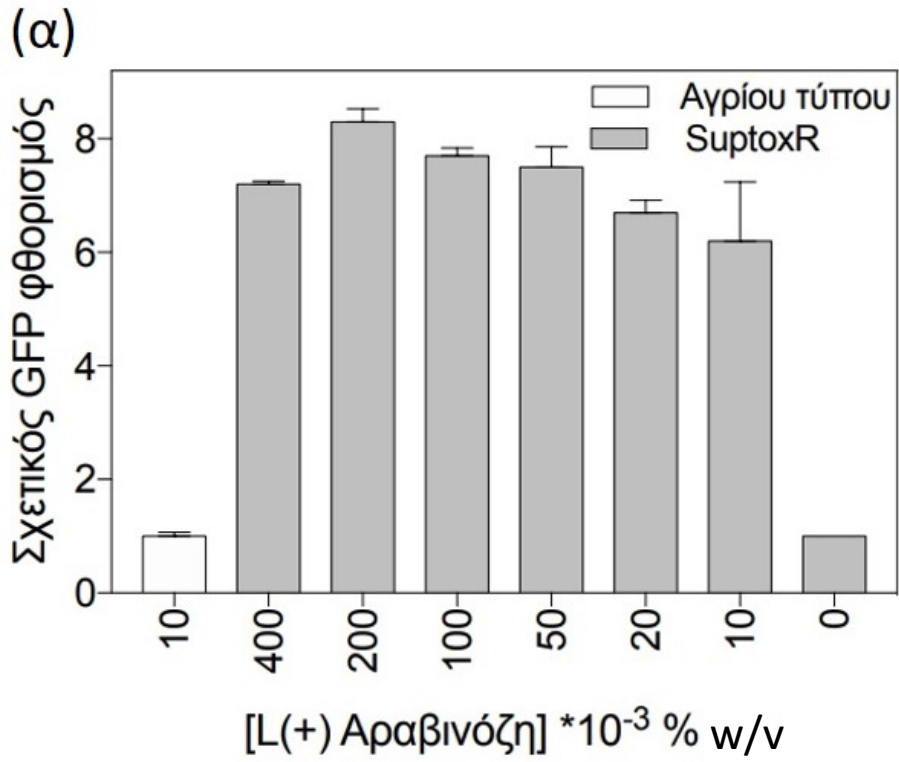
Σχήμα 21: Προσδιορισμός βέλτιστων επιπέδων της έκφρασης του γονιδίου *djlA* στα κύτταρα SuptoxD ρυθμίζοντας τη συγκέντρωση του επαγωγέα L(+) αραβινόζη.

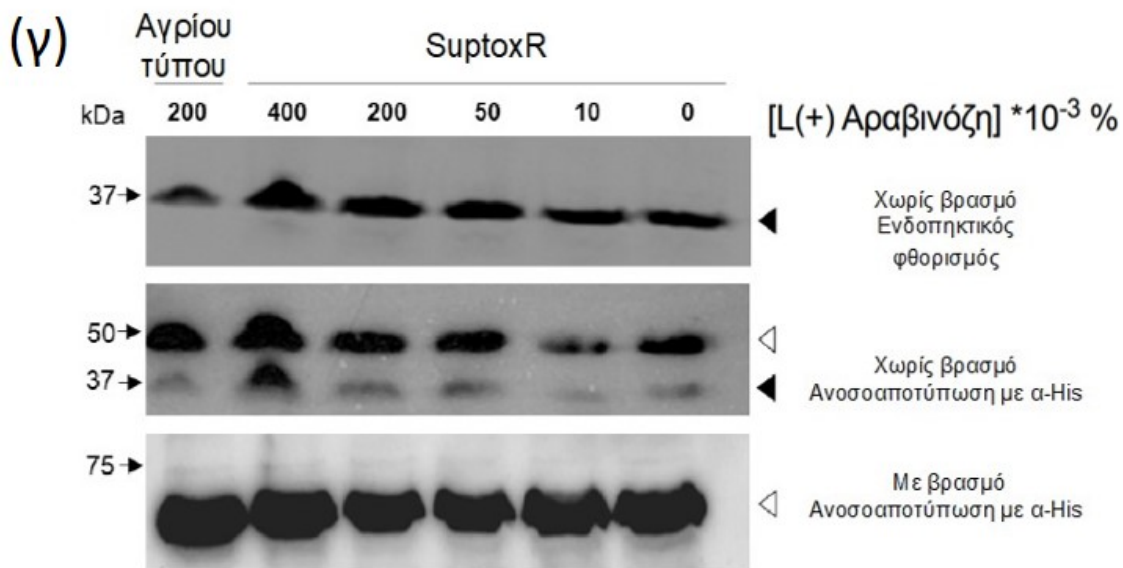
(α) Μέτρηση σχετικού GFP φθορισμού κυττάρων αγρίου τύπου και SuptoxD που προέρχονται από ίσο όγκο καλλιέργειας και παράγουν τη χιμαιρική πρωτεΐνη BR2-GFP μετά από προσθήκη 0.2 μg/mL aTc και εύρους συγκεντρώσεων L(+) αραβινόζης, για 16 ώρες στους 25 °C. Ο φθορισμός των κυττάρων αγρίου τύπου που παράγουν τη πρωτεΐνη BR2-GFP ορίστηκε ως μονάδα. (β) Μέτρηση σχετικού GFP φθορισμού κυττάρων αγρίου τύπου και SuptoxD που προέρχονται από ίσο όγκο καλλιέργειας και παράγουν τη χιμαιρική πρωτεΐνη NTR1(D03)-EGFP, όπως ακριβώς περιεγράφηκε στο (α). (γ) Ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες, ανάλυση ενδοπηκτικού φθορισμού, καθώς και ανάλυση μετά από ανοσοαποτύπωση κατά Western απομονωμένων ολικών μεμβρανών από κύτταρα αγρίου τύπου και SuptoxD που προέρχονται από ίσο όγκο καλλιέργειας και παράγουν τη χιμαιρική πρωτεΐνη NTR1(D03)-EGFP, όπως περιεγράφηκε στο (β), χρησιμοποιώντας τα αντισώματα αντι-HIS και αντι-FLAG που στοχεύουν στο C και N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης, αντίστοιχα, σε δείγματα όπου έχει προηγηθεί βρασμός (με βρασμό) και άλλα που δεν έχει προηγηθεί βρασμός (χωρίς βρασμό). Τα μαύρα και τα άσπρα βέλη υποδεικνύουν τις θέσεις της φθορίζουσας ζώνης (μαύρο βέλος) και της μη-φθορίζουσας ζώνης (άσπρο βέλος). Τα πειράματα στα (α) και (β) έχουν πραγματοποιηθεί σε τριπλές καλλιέργειες, τουλάχιστον 3 ανεξάρτητες φορές, και τα σφάλματα αντιπροσωπεύουν μία τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή (\pm s.e.m.). Προσαρμοσμένο σχήμα από Michou et al.¹²⁹

Χρησιμοποιώντας λοιπόν τη χιμαιρική κατασκευή NTR1(D03)-EGFP, διεξήχθησαν τα πειράματα SDS-PAGE ανάλυσης, ανάλυσης ανοσοαποτυπώματος και ενδοπηκτικού φθορισμού της πρωτεΐνης (Σχήμα 21γ). Ως αναμενόταν, στα δείγματα που δεν είχε προηγηθεί βρασμός, η πλήρους μήκους πρωτεΐνη NTR1(D03)-EGFP εντοπίζεται σε δύο ζώνες, με την κάτω ζώνη να είναι και η φθορίζουσα, υποδηλώνοντας τη σωστά αναδιπλωμένη διαμόρφωση της πρωτεΐνης. Όταν είχε προηγηθεί βρασμός της πρωτεΐνης, τότε αυτή οδηγήθηκε σε πλήρη μετουσίωση και τελικώς στη δημιουργία μιας μόνο ζώνης, μη φθορίζουσας. Όπως φαίνεται, η προσθήκη L(+) αραβινόζης μεταξύ 25-200 *10⁻⁴% w/v οδηγεί σε υψηλή παραγωγή τόσο συνολικής όσο και σωστά αναδιπλωμένης πρωτεΐνης, με τη βέλτιστη συγκέντρωση να προσδιορίζεται και πάλι στο 100 *10⁻⁴% w/v.

Για το SuptoxR, επιλέξαμε να υπερεκφράσουμε, και σε αυτή τη περίπτωση, τον ανθρώπινο υποδοχέα της βραδυκινίνης 2 (BR2) και την προκαρυωτικής προελεύσεως πρωτεΐνη MscL, η οποία είναι ένα υψηλής αγωγιμότητας κανάλι ιόντων του οργανισμού *Mycobacterium tuberculosis* (πίνακας 1, Κεφάλαιο 8). Και η πρωτεΐνη MscL ήταν χιμαιρική, καθώς, όπως και η BR2, ήταν συζευγμένη με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) στο καρβοξυτελικό της άκρο (C-terminus), κι επίσης, έφερε κι έναν επίτοπο ιστιδίνης (6xHis) στο καρβοξυτελικό της άκρο. Σε αυτή τη περίπτωση, οι διαφορετικές συγκεντρώσεις L(+) αραβινόζης που δοκιμάστηκαν στις βακτηριακές καλλιέργειες κυμαινόνταν μεταξύ 0-400*10⁻³% w/v. Όπως φαίνεται στο σχήμα 22α,β, μετρώντας τον παραγόμενο φθορισμό από κύτταρα SuptoxR που αντιστοιχούσαν σε ίσο όγκο καλλιέργειας και συγκρίνοντας πάντα με την καλλιέργεια-μάρτυρα, όπου δεν παράγεται η πρωτεΐνη Dj1A αλλά μόνο η διαμεμβρανική πρωτεΐνη BR2-GFP ή MscL-GFP από κύτταρα αγρίου τύπου,

γίνεται αντιληπτό πως η προσθήκη L(+) αραβινόζης μεταξύ 20-400 *10⁻³ % w/v οδηγεί σε υψηλή παραγωγή των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών BR2 (Σχήμα 22α) και MscL (Σχήμα 22β). Όπως και στη περίπτωση του στελέχους SuptoxD, έτσι και για το στέλεχος SuptoxR, απομονώθηκε το συνολικό κλάσμα κυτταρικών μεμβρανών από καλλιέργεια-μάρτυρα με κύτταρα αγρίου τύπου (απουσία υπερέκφρασης *rraA*) και από κύτταρα SuptoxR που είχαν χρησιμοποιηθεί για την υπερέκφραση της μεμβρανοπρωτεΐνης MscL. Μετά την απομόνωση των μεμβρανών αυτών, πραγματοποιήθηκε ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες, ανάλυση ενδοπηκτικού φθορισμού καθώς και ανάλυση μετά από ανοσοαποτύπωση κατά western. Όπως αναμενόταν, στα δείγματα που δεν είχε προηγηθεί βρασμός, η πλήρους μήκους πρωτεΐνη MscL-EGFP εντοπίζεται σε δύο ζώνες, με την κάτω ζώνη να είναι και η φθορίζουσα, υποδηλώνοντας τη σωστά αναδιπλωμένη διαμόρφωση της πρωτεΐνης. Όταν είχε προηγηθεί βρασμός της πρωτεΐνης, τότε αυτή οδηγήθηκε σε πλήρη μετουσίωση και τελικώς στη δημιουργία μίας μόνο ζώνης, μη φθορίζουσας. Όπως φαίνεται, η βέλτιστη συγκέντρωση L(+) αραβινόζης προσδιορίζεται να είναι μεταξύ 200-400 *10⁻³ % w/v (Σχήμα 22γ)¹²⁹.





Σχήμα 22: Προσδιορισμός βέλτιστων επιπέδων της έκφρασης του γονιδίου *rraA* στα κύτταρα SuptoxR ρυθμίζοντας τη συγκέντρωση του επαγωγέα L(+) αραβινόζη.

(α) Μέτρηση σχετικού GFP φθορισμού κυττάρων αγρίου τύπου και SuptoxR που προέρχονται από ίσο όγκο καλλιέργειας και παράγουν τη χιμαιρική πρωτεΐνη BR2-GFP μετά από προσθήκη 0.2 μg/mL aTc και εύρους συγκεντρώσεων L(+) αραβινόζης, για 16 ώρες στους 25 °C. Ο φθορισμός των κυττάρων αγρίου τύπου που παράγουν τη πρωτεΐνη BR2-GFP ορίστηκε ως μονάδα. (β) Μέτρηση σχετικού GFP φθορισμού κυττάρων αγρίου τύπου και SuptoxR που προέρχονται από ίσο όγκο καλλιέργειας και παράγουν τη χιμαιρική πρωτεΐνη MscL-EGFP, όπως ακριβώς περιεγράφηκε στο (α). (γ) ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες, ανάλυση ενδοπηκτικού φθορισμού, καθώς και ανάλυση μετά από ανοσοαποτύπωση κατά Western απομονωμένων ολικών μεμβρανών από κύτταρα αγρίου τύπου και SuptoxR που προέρχονται από ίσο όγκο καλλιέργειας και παράγουν τη χιμαιρική πρωτεΐνη MscL-EGFP, όπως περιεγράφηκε στο (β), χρησιμοποιώντας το αντίσωμα αντι-HIS που στοχεύει στο C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης, σε δείγματα όπου έχει προηγηθεί βρασμός (με βρασμό) και άλλα που δεν έχει προηγηθεί βρασμός (χωρίς βρασμό). Τα μαύρα και τα άσπρα βέλη υποδεικνύουν τις θέσεις της φθορίζουσας ζώνης (μαύρο βέλος) και της μη-φθορίζουσας ζώνης (άσπρο βέλος). Τα πειράματα στα (α) και (β) έχουν πραγματοποιηθεί σε τριπλές καλλιέργειες, τουλάχιστον 3 ανεξάρτητες φορές, και τα σφάλματα αντιπροσωπεύουν μία τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή (\pm s.e.m.). Προσαρμοσμένο σχήμα από Michou et al.¹²⁹

4.2 Βελτιστοποίηση της παραγωγικότητας των στελεχών SuptoxD και SuptoxR σε ανασυνδυασμένες μεμβρανοπρωτεΐνες ρυθμίζοντας τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που τις κωδικοποιούν

Έχοντας προσδιορίσει το εύρος των συγκεντρώσεων του επαγωγέα L(+) αραβινόζη που διασφαλίζει τα απαιτούμενα κυτταρικά επίπεδα για τις πρωτεΐνες *DjlA* και *RraA*, προχωρήσαμε στο δεύτερο επαγωγέα, την ανυδροτετρακυκλίνη. Η ανυδροτετρακυκλίνη, όπως προαναφέρθηκε, είναι αυτή που ρυθμίζει τα επίπεδα έκφρασης του εκάστοτε γονιδίου που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη που επιθυμούμε να παράξουμε. Έτσι, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η διαδικασία της παραγωγής πλήρους μήκους, σωστής αναδίπλωσης και ενσωμάτωσης με την ορθή τοπολογία στη μεμβράνη πρωτεϊνών, θελήσαμε να μελετήσουμε τη συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου που κωδικοποιεί για την εκάστοτε μεμβρανοπρωτεΐνη και των επιπέδων υπερπαραγωγής της τελικής ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Και στα δύο στελέχη, SuptoxD και SuptoxR, δοκιμάσαμε το ίδιο εύρος συγκεντρώσεων ανυδροτετρακυκλίνης οι οποίες κυμαίνονταν από 0-400 μg/L.

Όπως και στη μελέτη προσδιορισμού βέλτιστων επιπέδων έκφρασης των γονιδίων-καταστολέων *djlA* και *rraA* στα κύτταρα SuptoxD και SuptoxR αντίστοιχα, επιλέξαμε να υπερεκφράσουμε τις ίδιες μεμβρανικές πρωτεΐνες για κάθε στέλεχος. Έτσι, με τη χρήση του στελέχους SuptoxD παράξαμε τους δύο υποδοχείς συζευγμένους με πρωτεΐνες G, ευκαρυωτικής προελεύσεως: τον ανθρώπινο υποδοχέα της βραδυκινίνης 2 (BR2) και τον υποδοχέα νευροτενσίνης 1

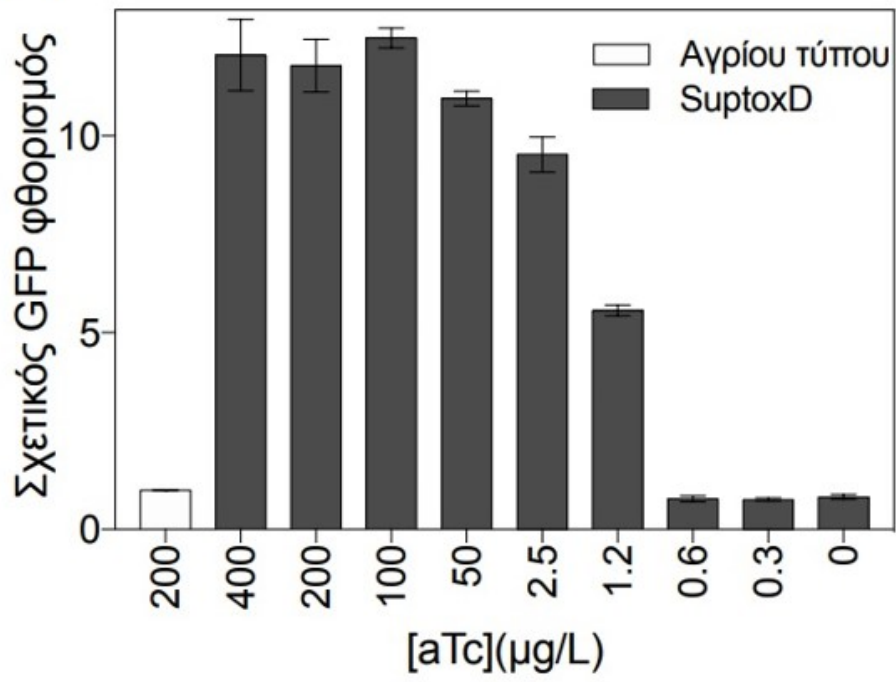
(NTR1(D03)) και με το στέλεχος SuptoxR, τον ανθρώπινο υποδοχέα της βραδυκινίνης 2 (BR2) και την προκαρυωτικής προελεύσεως πρωτεΐνη MscL. Όλες οι μεμβρανικές πρωτεΐνες ήταν και σε αυτή τη περίπτωση συζευγμένες με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) στο καρβοξυτελικό τους άκρο (C-terminus), έναν επίτοπο ιστιδίνης (8xHIS) στο καρβοξυτελικό τους άκρο (C-terminus), καθώς κι έναν επίτοπο FLAG στο αμινοτελικό τους άκρο (N-terminus), με εξαίρεση την MscL, η οποία στερείτο τον επίτοπο FLAG.

Όπως γίνεται προφανές, και για τα δύο στελέχη, μετρώντας τον παραγόμενο φθορισμό από κύτταρα SuptoxD και SuptoxR που προέρχονται από ίσο όγκο καλλιέργειας και συγκρίνοντας πάντα με την καλλιέργεια-μάρτυρα, όπου δεν παράγεται η πρωτεΐνη Dj1A ή RraA αντιστοίχως, αλλά μόνο η διαμεμβρανική πρωτεΐνη BR2-GFP ή NTR1(D03)-GFP ή MscL-GFP από κύτταρα αγρίου τύπου, γίνεται αντιληπτό πως η προσθήκη ανυδροτετρακυκλίνης μεταξύ 50-400 μg/L οδηγεί σε υψηλή παραγωγή των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών BR2-GFP (Σχήμα 23α) και NTR1(D03)-GFP (Σχήμα 23β), καθώς και BR2-GFP (Σχήμα 24α) και MscL-GFP (Σχήμα 24β).

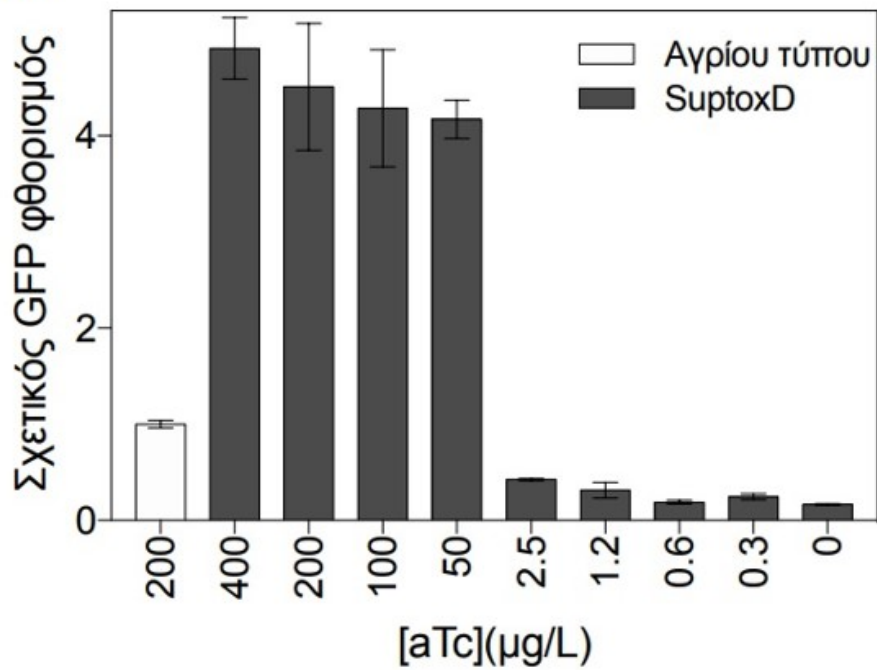
Τα αποτελέσματα του κυτταρικού φθορισμού επιβεβαιώθηκαν και πάλι με πειράματα απομόνωσης μεμβρανών. Σε αυτά, απομονώθηκαν ολικές μεμβράνες από καλλιέργεια- μάρτυρα με κύτταρα αγρίου τύπου (όπου δεν υπάρχει παραγωγή πρωτεΐνης Dj1A ή RraA) και από κύτταρα SuptoxD/R που είχαν χρησιμοποιηθεί για την υπερέκφραση της μεμβρανοπρωτεΐνης NTR1(D03)-EGFP και MscL-EGFP αντιστοίχως. Μετά την απομόνωση των μεμβρανών αυτών, πραγματοποιήθηκε ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες, ανάλυση ενδοπηκτικού φθορισμού (in gel fluorescence), καθώς και ανάλυση μετά από

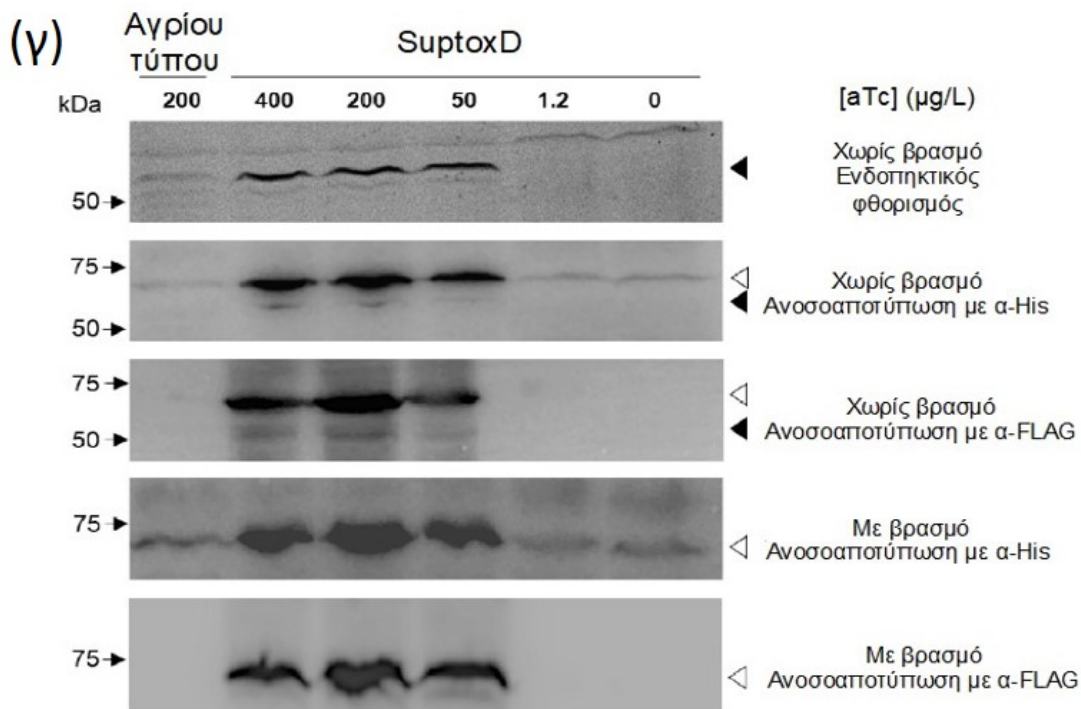
ανοσοαποτύπωση κατά Western. Ως αναμενόταν, στα δείγματα που δεν είχε προηγηθεί βρασμός, η πλήρους μήκους πρωτεΐνη NTR1(D03)-EGFP και MscL-EGFP εντοπίζεται σε δύο ζώνες, με την κάτω ζώνη να είναι και η φθορίζουσα, υποδηλώνοντας τη σωστά αναδιπλωμένη διαμόρφωση της πρωτεΐνης. Όταν είχε προηγηθεί βρασμός των δειγμάτων, τότε οι πρωτεΐνες οδηγήθηκαν σε πλήρη μετουσίωση και τελικώς στη δημιουργία μίας μόνο ζώνης, μη φθορίζουσας (Σχήμα 23γ, 24γ). Όπως γίνεται προφανές, η προσθήκη ανυδροτετρακυκλίνης μεταξύ 50-400 μg/L οδηγεί σε υψηλή παραγωγή τόσο ολικής, όσο και σωστά αναδιπλωμένης και λειτουργικής πρωτεΐνης¹²⁹.

(α)



(β)

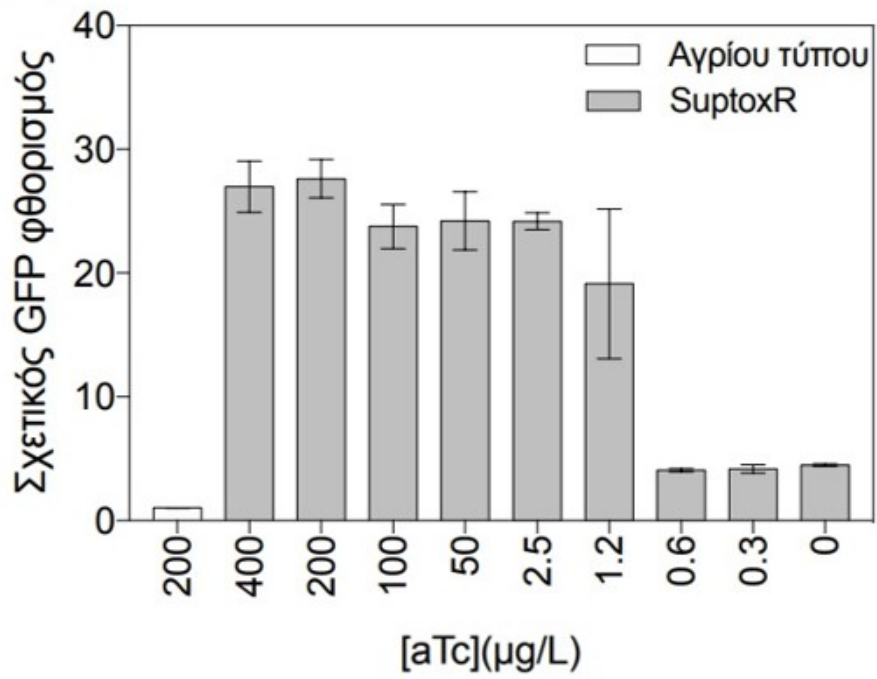




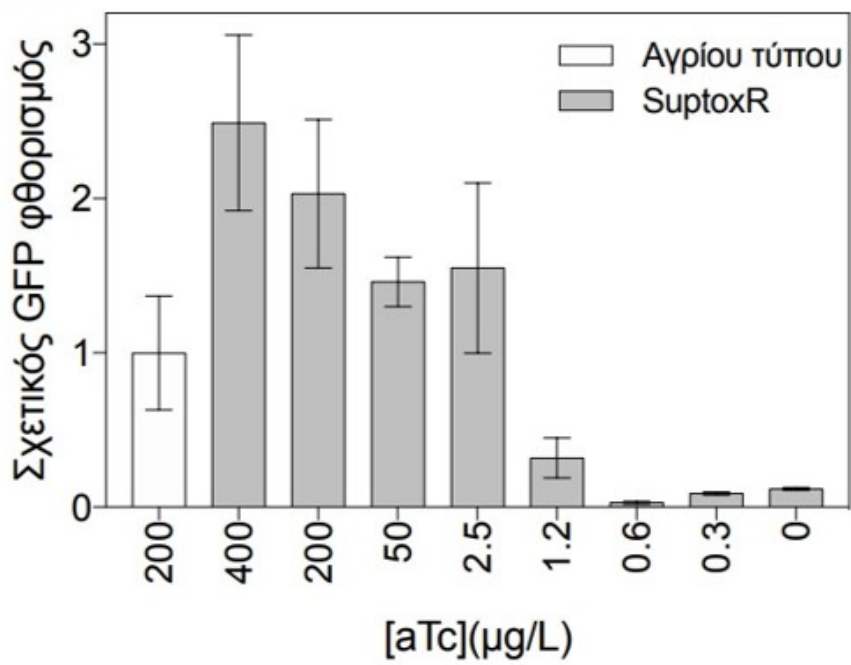
Σχήμα 23: Βελτιστοποίηση της ανασυνδυασμένης παραγωγής διαμεμβρανικών πρωτεϊνών στα κύτταρα SuptoxD ρυθμίζοντας τα επίπεδα ανυδροτετρακυκλίνης (aTc).

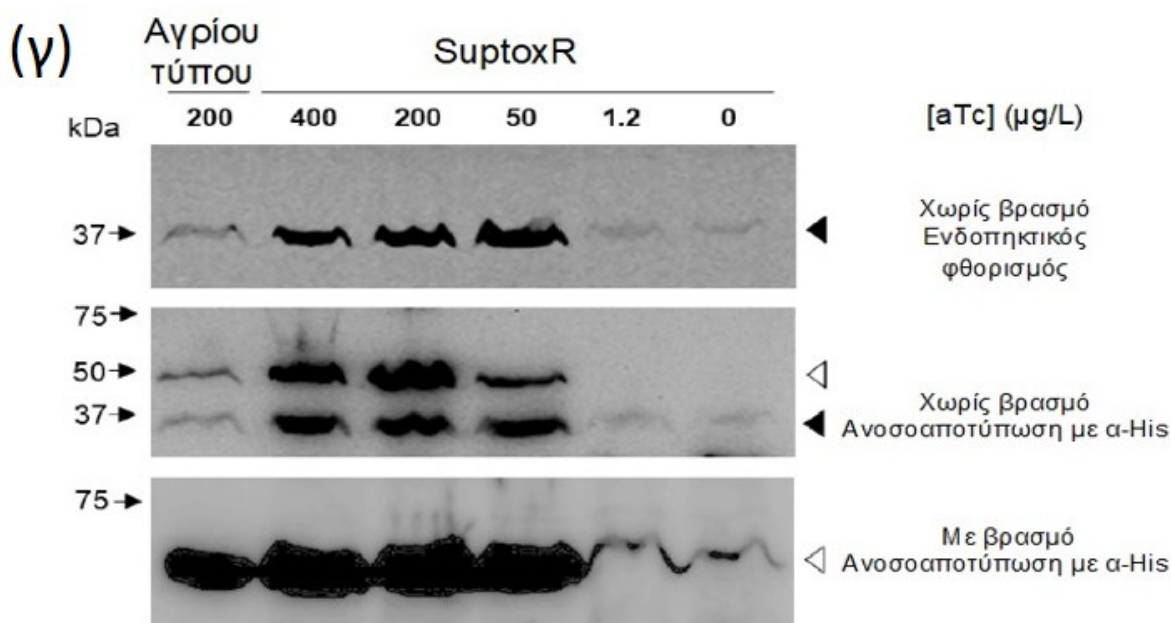
(α) Μέτρηση σχετικού GFP φθορισμού κυττάρων αγρίου τύπου και SuptoxD που προέρχονται από ίσο όγκο καλλιέργειας και παράγουν τη χιμαιρική πρωτεΐνη BR2-GFP μετά από προσθήκη $100 \cdot 10^{-4} \% w/v$ L(+) αραβινόζης και εύρους συγκεντρώσεων ανυδροτετρακυκλίνης (aTc), για 16 ώρες στους 25 °C. Ο φθορισμός των κυττάρων αγρίου τύπου που παράγουν τη πρωτεΐνη BR2-GFP ορίστηκε ως μονάδα. (β) Ομοίως με (α) για τη χιμαιρική πρωτεΐνη NTRI(D03)-GFP (γ) Ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες, ανάλυση ενδοπηκτικού φθορισμού, καθώς και ανάλυση μετά από ανοσοαποτύπωση κατά Western απομονωμένων ολικών μεμβρανών από κύτταρα αγρίου τύπου και SuptoxD που προέρχονται από ίσο όγκο καλλιέργειας και παράγουν τη χιμαιρική πρωτεΐνη NTRI(D03)-EGFP, όπως περιεγράφηκε στο (β), χρησιμοποιώντας τα αντισώματα αντι-HIS και αντι-FLAG που στοχεύουν στο C και N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης, αντίστοιχα, σε δείγματα όπου έχει προηγηθεί βρασμός (με βρασμό) και άλλα που δεν έχει προηγηθεί βρασμός (χωρίς βρασμό). Τα μαύρα και τα άσπρα βέλη υποδεικνύουν τις θέσεις της φθορίζουσας ζώνης (μαύρο βέλος) και της μη-φθορίζουσας ζώνης (άσπρο βέλος). Τα πειράματα στα (α) και (β) έχουν πραγματοποιηθεί σε τριπλές καλλιέργειες, τουλάχιστον 3 ανεξάρτητες φορές, και τα σφάλματα αντιπροσωπεύουν μία τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή (\pm s.e.m.). Προσαρμοσμένο σχήμα από Michou et al.¹²⁹.

(α)



(β)





Σχήμα 24: Βελτιστοποίηση της ανασυνδυασμένης παραγωγής διαμεμβρανικών πρωτεϊνών στα κύτταρα SuptoxR ρυθμίζοντας τα επίπεδα ανυδροτετρακυκλίνης (aTc)

(α) Μέτρηση σχετικού GFP φθορισμού κυττάρων αγρίου τύπου και SuptoxR που προέρχονται από ίσο όγκο καλλιέργειας και παράγουν τη χιμαιρική πρωτεΐνη BR2-GFP μετά από προσθήκη $200 \cdot 10^{-3} \%w/v$ L(+) αραβινόζης και εύρους συγκεντρώσεων ανυδροτετρακυκλίνης για 16 ώρες στους 25 °C. Ο φθορισμός των κυττάρων αγρίου τύπου που παράγουν τη πρωτεΐνη BR2-GFP ορίστηκε ως μονάδα. (β) Μέτρηση σχετικού GFP φθορισμού κυττάρων αγρίου τύπου και SuptoxR που προέρχονται από ίσο όγκο καλλιέργειας και παράγουν τη χιμαιρική πρωτεΐνη MscL-EGFP, όπως ακριβώς περιεγράφηκε στο (α). (γ) Ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες, ανάλυση ενδοπηκτικού φθορισμού, καθώς και ανάλυση μετά από ανοσοαποτύπωση κατά Western απομονωμένων ολικών μεμβρανών από κύτταρα αγρίου τύπου και SuptoxR που προέρχονται από ίσο όγκο καλλιέργειας και παράγουν τη χιμαιρική πρωτεΐνη MscL-EGFP, όπως περιεγράφηκε στο (β), χρησιμοποιώντας το αντίσωμα αντι-HIS που στοχεύει στο C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης, σε δείγματα όπου έχει προηγηθεί βρασμός (με βρασμό) και άλλα που δεν έχει προηγηθεί βρασμός (χωρίς βρασμό). Τα μαύρα και τα άσπρα βέλη υποδεικνύουν τις θέσεις της φθορίζουσας ζώνης (μαύρο βέλος) και της μη-φθορίζουσας ζώνης (άσπρο βέλος). Τα πειράματα στα (α) και (β) έχουν πραγματοποιηθεί σε τριπλές καλλιέργειες, τουλάχιστον 3 ανεξάρτητες φορές, και τα σφάλματα αντιπροσωπεύουν μία τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή (\pm s.e.m.). Προσαρμοσμένο σχήμα από Michou et al.¹²⁹

4.3 Βελτιστοποίηση της παραγωγικότητας των στελεχών SuptoxD και SuptoxR σε ανασυνδυσμένες μεμβρανοπρωτεΐνες ρυθμίζοντας τις συνθήκες βακτηριακής καλλιέργειας

Καθώς προσδιορίσαμε τις βέλτιστες συγκεντρώσεις επαγωγέων L(+) αραβινόζης και ανυδροτετρακυκλίνης (aTc) προκειμένου η παραγωγή διαμεμβρανικών πρωτεϊνών να φθάσει στη μέγιστή της απόδοση, θελήσαμε να διερευνήσουμε άλλες δύο παραμέτρους οι οποίες, όπως έχει δειχθεί σε προηγούμενες μελέτες⁸⁴, είναι εξαιρετικά σημαντικές για την απόδοση του βέλτιστου αποτελέσματος. Οι παράμετροι αυτές είναι η θερμοκρασία και η διάρκεια που λαμβάνει χώρα η υπερέκφραση των μεμβρανοπρωτεϊνών.

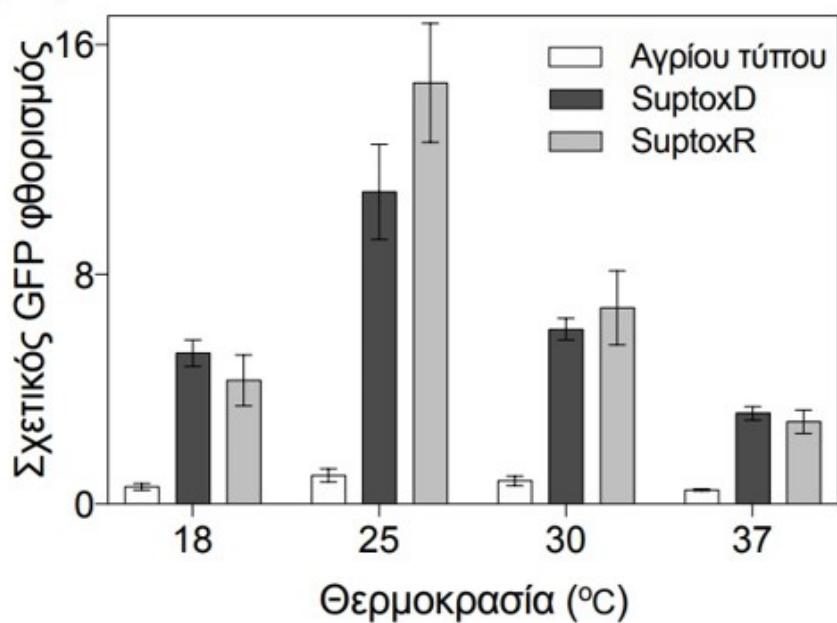
Έτσι, δοκιμάσαμε την υπερέκφραση της χιμαιρικής πρωτεΐνης BR2-GFP σε κύτταρα αγρίου τύπου, σε κύτταρα SuptoxD και SuptoxR στις εξής 4 διαφορετικές θερμοκρασίες: 18 °C, 25 °C, 30°C και 37 °C με συνεχή ανάδευση για 16 ώρες (o/n). Στις καλλιέργειες προστέθηκαν οι επαγωγείς L(+) αραβινόζη και ανυδροτετρακυκλίνη (aTc) στις συγκεντρώσεις που είχαμε καταλήξει πως επάγουν, στον πλέον ικανοποιητικό και αποτελεσματικό βαθμό, την παραγωγή πλήρους μήκους, σωστής αναδίπλωσης και ενσωμάτωσης με την ορθή τοπολογία στη μεμβράνη πρωτεΐνης. Όπως γίνεται αντιληπτό, η βέλτιστη θερμοκρασία για την επιτυχή υπερπαραγωγή του υποδοχέα της βραδυκινίνης 2 (BR2), με εμφανή διαφορά από τις άλλες θερμοκρασίες, ήταν αυτή των 25 °C. Και σε αυτή την περίπτωση, μετρήθηκε ο παραγόμενος φθορισμός από κύτταρα SuptoxD και SuptoxR που προέρχονται από ίσο όγκο καλλιέργειας και συγκρίθηκε με τις

καλλιέργειες-μάρτυρα, όπου δεν παράχθηκε η πρωτεΐνη DjlA και RraA αντίστοιχα, αλλά μόνο η διαμεμβρανική πρωτεΐνη BR2-GFP από κύτταρα αγρίου τύπου.

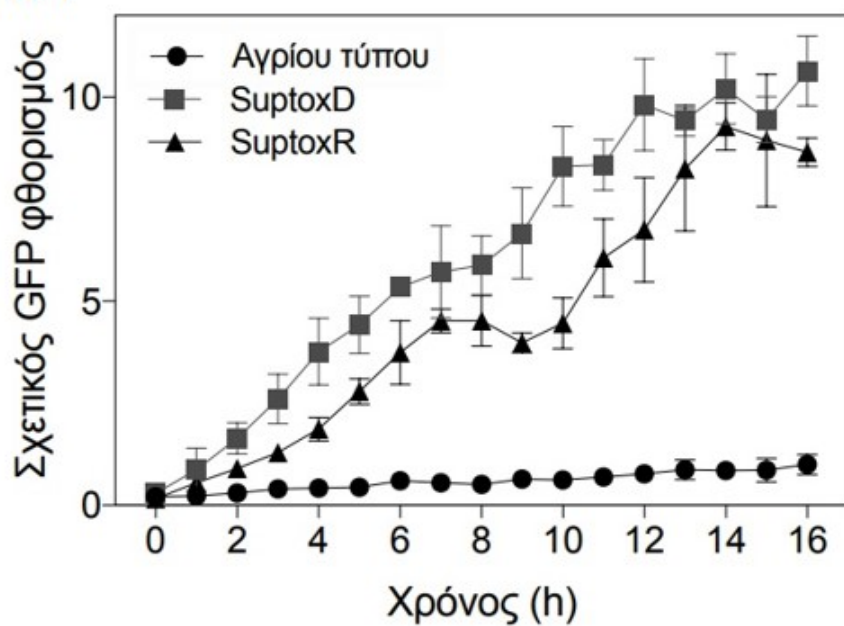
Χρησιμοποιώντας τις ήδη προσδιορισμένες συνθήκες, προχωρήσαμε στην εξέταση της διάρκειας της υπερέκφρασης. Όπως γίνεται προφανές και στο σχήμα 25β, η ογκομετρική παραγωγή της χιμαιρικής πρωτεΐνης BR2-GFP σε κύτταρα αγρίου τύπου, σε κύτταρα SuptoxD και SuptoxR αυξήθηκε ορατά και για τα δύο στελέχη μέχρι και τις 16 ώρες (από τη στιγμή που προστέθηκε στη καλλιέργεια ο επαγωγέας της ανυδροτετρακυκλίνης) συνεχούς παραγωγής υπό ανάδευση στους 25 °C.

Με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής, θελήσαμε να μετρήσουμε και την παραγωγή των χιμαιρικών πρωτεϊνών BR2-GFP και NTRI(D03)-GFP σε κύτταρα αγρίου τύπου, SuptoxD και SuptoxR ανά κύτταρο αυτή τη φορά. Μετά την ανάλυση των αποτελεσμάτων, και όπως φαίνεται στο σχήμα 25γ, όχι μόνο η παραγωγικότητα στα στελέχη SuptoxD και SuptoxR ήταν σαφώς μεγαλύτερη συγκριτικά με τα κύτταρα αγρίου τύπου για την BR2-GFP (επάνω) και την NTRI(D03)-GFP(κάτω), αλλά επιπλέον και οι πληθυσμοί των κυττάρων ήταν ομοιογενείς, ακόμα μια μετά το πέρας των 16 ωρών συνεχούς παραγωγής. Αυτό παρατηρήθηκε και στις δύο μεμβρανικές πρωτεΐνες που εξετάστηκαν, παρά το γεγονός πως ήταν εξαιρετικά τοξικές^{76, 87, 90}, υποδεικνύοντας τη γενετική σταθερότητα των χρησιμοποιούμενων στελεχών¹²⁹.

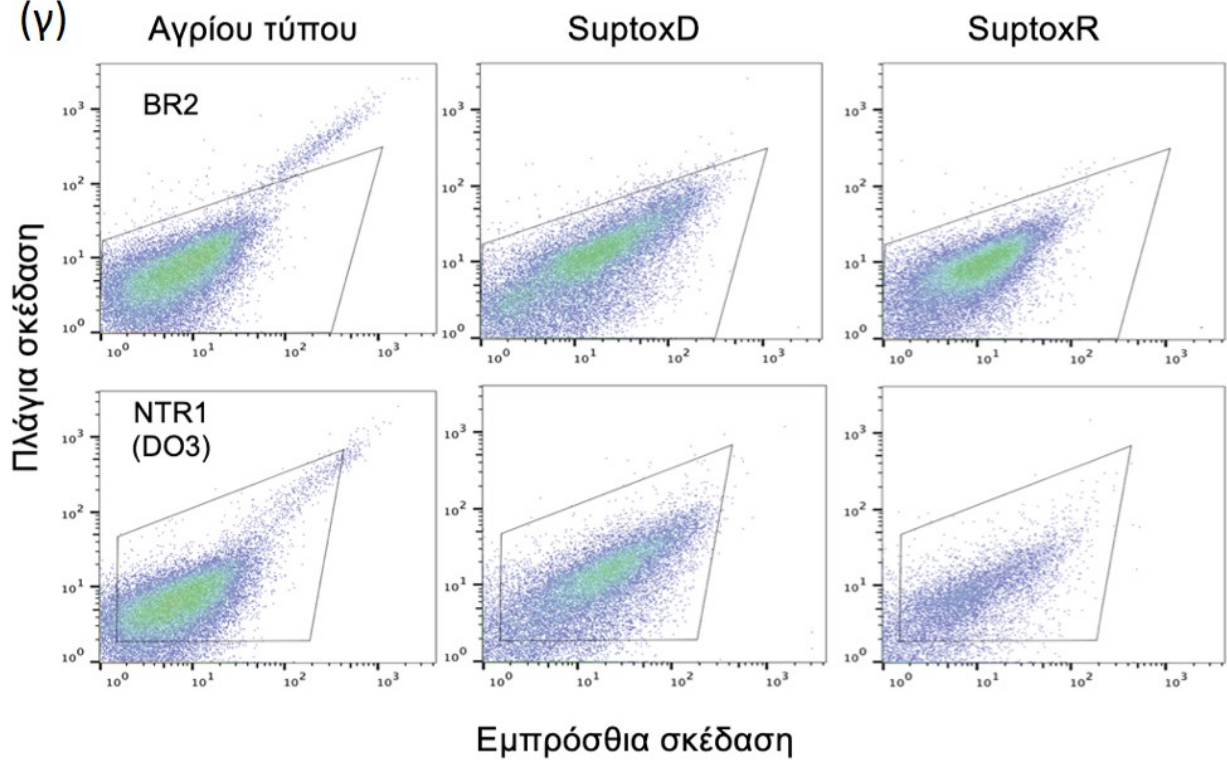
(α)



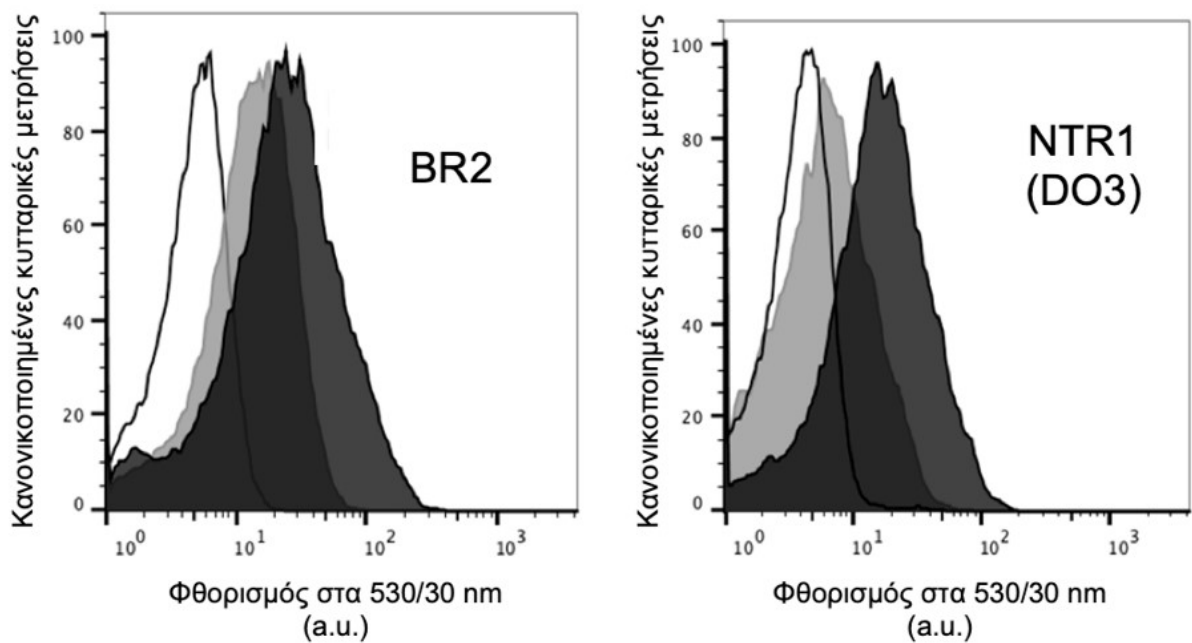
(β)



(γ)



(δ)



Σχήμα 25: Προσδιορισμός βέλτιστων συνθηκών θερμοκρασίας και διάρκειας υπερέκφρασης διαμεμβρανικών πρωτεϊνών στα *E.coli* στελέχη SuptoxD και SuptoxR.

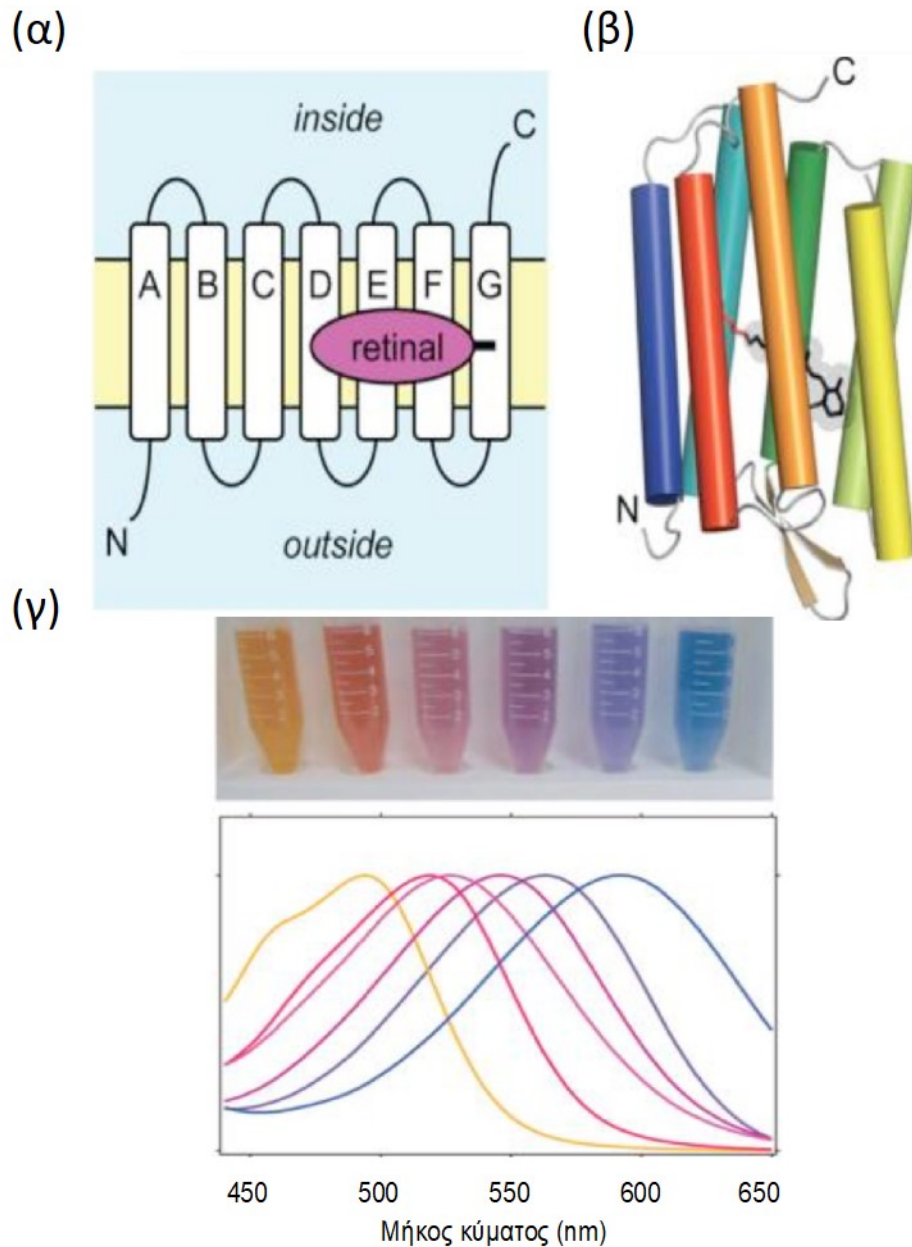
(α) Μέτρηση σχετικού GFP φθορισμού κυττάρων αγρίου τύπου, SuptoxD και SuptoxR που προέρχονται από ίσο όγκο καλλιέργειας και παράγουν τη χιμαιρική πρωτεΐνη BR2-GFP μετά από προσθήκη $100 \cdot 10^{-4} \% w/v$ και $200 \cdot 10^{-3} \% w/v$ L(+) αραβινόζης αντίστοιχα, και 200 $\mu g/L$ ανυδροτετρακυκλίνης για 16 ώρες στις θερμοκρασίες που αναγράφονται. Ο φθορισμός των κυττάρων αγρίου τύπου που παράγουν τη πρωτεΐνη BR2-GFP στους 25°C ορίστηκε ως μονάδα. Τα πειράματα έχουν πραγματοποιηθεί σε τριπλές καλλιέργειες, τουλάχιστον 3 ανεξάρτητες φορές, και τα σφάλματα αντιπροσωπεύουν μία τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή. (β) Σύγκριση του σχετικού φθορισμού κυττάρων που προέρχονται από ίσο όγκο καλλιέργειας όπου παράγεται η χιμαιρική πρωτεΐνη BR2-GFP με χρήση των στελεχών SuptoxD, SuptoxR, καθώς και κυττάρων αγρίου τύπου μετά από προσθήκη $100 \cdot 10^{-4} \% w/v$ (SuptoxD) ή $200 \cdot 10^{-3} \% w/v$ (SuptoxR) L(+) αραβινόζης, 200 $\mu g/L$ ανυδροτετρακυκλίνης στους 25°C σε διαφορετικές χρονικές στιγμές από τη στιγμή που προστέθηκε στην καλλιέργεια ο επαγωγέας ανυδροτετρακυκλίνη. Ο φθορισμός των κυττάρων αγρίου τύπου που παράγουν τη πρωτεΐνη BR2-GFP στις 16 ώρες ορίστηκε ως μονάδα. Τα πειράματα έχουν πραγματοποιηθεί σε τριπλές καλλιέργειες, και τα σφάλματα αντιπροσωπεύουν μία τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή (\pm s.e.m.). (γ) Διαγράμματα εμπρόσθιας και πλάγιας σκέδασης μετά από κυτταρομετρία ροής των SuptoxD, SuptoxR, και αγρίου τύπου κυττάρων που υπερπαράγουν την πρωτεΐνη BR2-GFP (επάνω) και NTRI(D03)-GFP (κάτω) με προσθήκη $100 \cdot 10^{-4} \% w/v$ (SuptoxD) ή $200 \cdot 10^{-3} \% w/v$ (SuptoxR) L(+) αραβινόζης και 200 $\mu g/L$ ανυδροτετρακυκλίνης για 16 h στους 25 °C. (δ) Σύγκριση των επιπέδων φθορισμού μεμονωμένων *E. coli* κυττάρων αγρίου τύπου, SuptoxD και SuptoxR τα οποία υπερπαράγουν τις χιμαιρικές πρωτεΐνες BR2-GFP (αριστερά) και NTRI(D03)-GFP (δεξιά). Η οριοθέτηση κυττάρων που μετρηθήκαν παρουσιάζεται με μια γκρι γραμμή (αριστερά). Προσαρμοσμένο σχήμα από Michou et al.¹²⁹

4.4 Τα στελέχη SuptoxD και SuptoxR παράγουν επιτυχώς αυξημένα επίπεδα απομονωμένης λειτουργικής διαμεμβρανικής πρωτεΐνης

Έχοντας ορίσει και βελτιστοποιήσει τις συνθήκες έκφρασης, η χρήση των στελεχών SuptoxD και SuptoxR καταφέρνουν να παράξουν σε αυξημένα επίπεδα ποικίλες μεμβρανικές πρωτεΐνες, διαφορετικών χαρακτηριστικών και ιδιοτήτων, ευκαρυωτικής ή προκαρυωτικής προελεύσεως, τοξικών ή μη. Έχει αποδειχθεί μέσω των διαφορετικών προσεγγίσεων που ακολουθήσαμε πως η παραγόμενη πρωτεΐνη είναι πλήρους μήκους, σωστής αναδίπλωσης και ενσωμάτωσης με την ορθή τοπολογία στη μεμβράνη. Το επόμενο ερώτημα που θέσαμε ήταν αν η πρωτεΐνη ήταν και βιολογικώς λειτουργική, προκειμένου τα στελέχη μας να μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν για παραγωγή ανασυνδυασμένων μεμβρανοπρωτεϊνών κατάλληλων για λειτουργικές μελέτες.

Προκειμένου να διερευνήσουμε αν τα στελέχη μας μπορούν να χρησιμοποιηθούν τοιουτοτρόπως, επιλέξαμε μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη ροδοψίνης (deltarhodopsin). Οι ροδοψίνες εντοπίζονται στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, στα βακτήρια, καθώς και στα αρχαία και ο ρόλος τους είναι να απορροφούν φωτόνια για παραγωγή ενέργειας ή για σηματοδότηση. Κι οι δύο αυτές ενέργειες είναι σημαντικές για τους οργανισμούς προκειμένου να επιβιώσουν και να προσαρμοστούν στο περιβάλλον τους. Ενώ οι κατώτεροι οργανισμοί χρησιμοποιούν τις βακτηριακές ροδοψίνες και για τους δύο παραπάνω σκοπούς, οι ανώτεροι οργανισμοί (ζώα, άνθρωποι κτλ.), χρησιμοποιούν μία διαφορετική οικογένεια ροδοψινών, μία πολύ εξειδικευμένη υποομάδα των GPCRs. Αυτός ο

τύπος ροδοψινών χρησιμοποιείται στην όραση, για την εύρυθμη λειτουργία του κερκαδικού ρολογιού. Παρά το γεγονός πως οι ροδοψίνες που εντοπίζονται στους κατώτερους (ως φωτοελεγχόμενες αντλίες ιόντων ή μορίων χλωρίου, είτε ακόμα ως αισθητήρες) και στους ανώτερους οργανισμούς δε χαρακτηρίζονται από ομολογία στις αλληλουχίες τους, μοιράζονται μία κοινή αρχιτεκτονική στη δομή τους: 7 διακριτά διαμεμβρανικά τμήματα, με το αμινοτελικό άκρο (N-terminus) της πρωτεΐνης να βρίσκεται στον εξωκυττάριο χώρο, ενώ το καρβοξυτελικό άκρο (C-terminus) να εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. Η πρωτεΐνη αποτελεί μία οψίνη η οποία διαθέτει θέση πρόσδεσης ρετινάλης, μέσω της βάσης Schiff, στην Λυσίνη216 (Lys216) της πρωτεΐνης (Σχήμα 26α,β) . Η ρετινάλη αποτελεί ένα παράγωγο της βιταμίνης A, και παρέχεται στον οργανισμό μέσω του β-καροτενίου. Στους κατώτερους οργανισμούς, η πρόσληψη φωτός μετατρέπει τη ρετινάλη της ροδοψίνης από τη μορφή all-trans στη μορφή 13-cis, ξεκινώντας έτσι μία φωτοπερίοδο η οποία ακολουθείται από δομικές αλλαγές, μετατοπίζοντας ένα πρωτόνιο στην εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης, δημιουργώντας τελικώς μια διαβάθμιση πρωτονίων. Το χαρακτηριστικό το οποίο ξεχωρίζει τις ροδοψίνες από τις άλλες πρωτεΐνες είναι πως ανάλογα με το μήκος κύματος στο οποίο απορροφούν κατά την ενεργή τους κατάσταση, αποκτούν χρώμα. Ενώ το χρωμοφόρο που χρησιμοποιούν όλες οι ροδοψίνες είναι το ίδιο (ρετινάλη), το μέγιστο που απορροφά η κάθε πρωτεΐνη είναι διαφορετικό για την καθεμία (άρα και διαφορετικό χρώμα), προδίδοντας έτσι την ενεργή κατάσταση της πρωτεΐνης (Σχήμα 26γ).



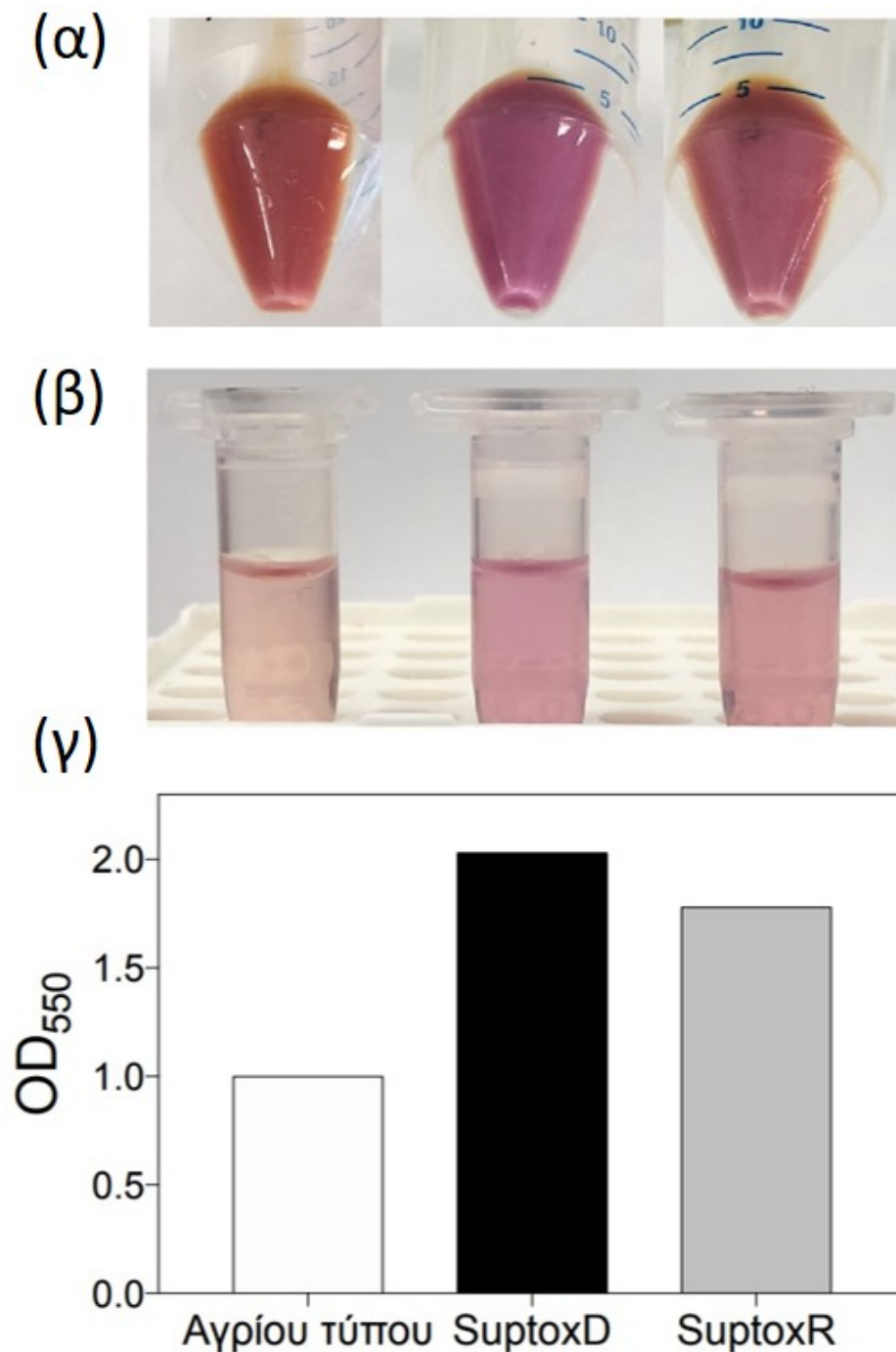
Σχήμα 26: Χαρακτηριστικά των ροδοψινών.

(α) Τοπολογία των ροδοψινών: διαπερνούν τη μεμβράνη με 7 διαμεμβρανικά τμήματα, και η ρετινάλη εντοπίζεται προσδεσμένη στο 7^ο διαμεμβρανικό τμήμα (τμήμα G) (β) Αναπαράσταση της διαμόρφωσης της βακτηριοροδοψίνης, συζευγμένη με την all-trans-ρετινάλη (PDB ID: 1C3W), (γ) Κάθε μικροβιακή ροδοψίνη χαρακτηρίζεται κι από διαφορετικό χρώμα, ανάλογα με το μήκος κύματος απορρόφησής της. Προσαρμοσμένα σχήματα από Ernst et al.¹³¹.

Η ροδοψίνη που επιλέξαμε για τη μελέτη μας έχει απομονωθεί από το αρχαίο *Haloterrigena turkmenica* (JCM9743)¹³² και εφεξής θα αποκαλείται HtdR. Ανήκει στην οικογένεια των ροδοψινών από Αρχαία (archaeal rhodopsin family (ARF)), και λειτουργεί ως φωτοελεγχόμενη αντλία πρωτονίων. Η αντλία αυτή προσδένει το χρωμοφόρο ρετινάλη (all-trans-retinal) και όταν είναι η πρωτεΐνη είναι σε ενεργή μορφή, αποκτά ένα πολύ χαρακτηριστικό μωβ χρώμα, το οποίο απορροφά στον μέγιστο βαθμό στο φάσμα του ορατού και συγκεκριμένα στα 550 nm. Πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν ασχοληθεί με τη συγκεκριμένη ροδοψίνη, καθώς αποτελεί εξαιρετικό μοντέλο βιοφυσικών μελετών λόγω των ιδιαίτερων φωτοεπαγόμενων ιδιοτήτων του, όπως και ποικίλες άλλες μικροβιακές ροδοψίνες¹³⁰. Μάλιστα, προσφάτως, η πρωτεΐνη HtdR χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή μιτοχονδρίων με φωτοενεργητικές ιδιότητες¹³³.

Γνωρίζοντας πως η HtdR μπορεί να παραχθεί σε λειτουργική μορφή στο βακτήριο *E. coli*¹³² και η λειτουργικότητά αυτή να εξακριβωθεί με εξαιρετικά απλό τρόπο¹³⁴, τη χρησιμοποιήσαμε ως εργαλείο προκειμένου να διαπιστώσουμε αν τα στελέχη SuptoxD και SuptoxR υπό τις βέλτιστες συνθήκες, μπορούν να παράξουν αυξημένα ποσά λειτουργικής διαμεμβρανικής πρωτεΐνης. Όντως, μετά την υπερέκφραση της πρωτεΐνης στα στελέχη SuptoxD και SuptoxR και της προσθήκης ρετινάλης στο θρεπτικό μέσο, ταυτόχρονα με την επαγωγή της παραγωγής της, διαπιστώσαμε μετά το πέρας της διαδικασίας, πως τα κύτταρα SuptoxD και SuptoxR είχαν καταφέρει να παράξουν επιτυχώς αυξημένα επίπεδα, τόσο της ολικώς παραγμένης (Σχήμα 30α), όσο και του κλάσματος της απομονωμένης, με χρήση του επιφανειοενεργού DDM (n-Dodecyl β-D-maltoside) (Σχήμα 30β), λειτουργικής πρωτεΐνης, συγκρινόμενης με τα κύτταρα αγρίου τύπου. Όπως φαίνεται, το χρώμα

του κατακρημνισμένου κυτταρικού πληθυσμού των στελεχών SuptoxD και SuptoxR είναι πολύ πιο έντονο, συγκριτικά με τα κύτταρα αγρίου τύπου (Σχήμα 27α). Αυτό γίνεται πιο προφανές κατά την παρατήρηση του χρώματος της απομονωμένης, με χρήση επιφανειοενεργού, πρωτεΐνης (Σχήμα 27β), γεγονός το οποίο επιβεβαιώνεται κι από τις μετρήσεις σχετικής απορρόφησης στα 550 nm (Σχήμα 27γ)¹²⁹.



Σχήμα 27: Η χρήση των *E. coli* στελεχών SuptoxD και SuptoxR παράγουν αυξημένες ποσότητες λειτουργικής HtdR πρωτεΐνης.

(α) Φωτογραφίες έγχρωμων κυτταρικών πληθυσμών (pellets) που προέρχονται από ίσο όγκο καλλιέργειας όπου παράγεται η πρωτεΐνη HtdR με χρήση των στελεχών SuptoxD, SuptoxR, καθώς και κυττάρων αγρίου τύπου μετά από προσθήκη $100 \cdot 10^{-4}\%$ w/v (SuptoxD) ή $200 \cdot 10^{-3}\%$ w/v (SuptoxR) L(+) αραβινόζης, 200 μg/L ανυδροτετρακυκλίνης και 10 μM ρετινάλης (all-trans-retinal) στους 25 °C, για 16 ώρες σε συνθήκες πλήρους σκότους. (β) Φωτογραφίες του κλάσματος της απομονωμένης, με χρήση του επιφανειοενεργού DDM, πρωτεΐνης, η οποία προέρχεται από ίσο όγκο των καλλιεργειών των κυττάρων που φαίνονται στο (α). (γ) Σχετική απορρόφηση στα 550nm των δειγμάτων του (β). Προσαρμοσμένο σχήμα από Michou et al.¹²⁹

4.5 Η χρήση των στελεχών SuptoxD και SuptoxR αποφέρει υψηλές αποδόσεις απομονωμένης διαμεμβρανικής πρωτεΐνης, ποιοτικά κατάλληλης για βιοχημικές και δομικές μελέτες

Η ετερόλογη παραγωγή διαμεμβρανικών πρωτεϊνών στο βακτήριο *E. coli*, όπως έχει ήδη αναλυθεί εκτενώς, αποτελεί μία αρκετά απαιτητική διαδικασία. Απαιτείται αρκετός χρόνος και προσπάθεια προκειμένου να παραχθεί σημαντική ποσότητα ενεργής πρωτεΐνης, η οποία να είναι ποιοτικά κατάλληλη για περαιτέρω απομόνωση και εν συνεχεία, για μελέτες δομής και λειτουργίας της. Οι μελέτες αυτές συνήθως απαιτούν μιλιγραμμάρια (mg) πρωτεΐνης η οποία πρέπει να είναι καθαρή και σε κατάσταση μονοδιασποράς, καθώς επίσης εξαιρετικά σημαντικό παράγοντα αποτελεί η σταθερότητα της πρωτεΐνης αυτής εκτός του φυσικού της περιβάλλοντος, δηλαδή της μεμβράνης²³.

Η απομόνωση των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών από τη μεμβράνη επιτυγχάνεται με τη χρήση κάποιου επιφανειοενεργού ή κάποιου συνδυασμού επιφανειοενεργού/λιπιδικού συστήματος. Η επιλογή του κατάλληλου επιφανειοενεργού διαδραματίζει πολύ σημαντικό βήμα καθώς μπορεί να επιτρέψει την απομόνωση μεγάλης ποσότητας καθαρής, σταθερής και λειτουργικής πρωτεΐνης. Υπάρχουν περιπτώσεις όπου η επιλογή ενός μόνο επιφανειοενεργού να μην είναι αρκετή, και γι αυτό το λόγο μπορεί να χρησιμοποιηθεί άλλο επιφανειοενεργό για την απομόνωση της πρωτεΐνης από τη μεμβράνη, και εν συνεχεία αυτό να αντικατασταθεί από ένα άλλο για την απομόνωση και τις δομικές/ λειτουργικές μελέτες.

Υπάρχουν πολλές κατηγορίες επιφανειοενεργών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν, η καθεμία με τα δικά της χαρακτηριστικά. Τα ιοντικά επιφανειοενεργά θεωρούνται τα πιο δραστικά για την απομόνωση των πρωτεϊνών από τη μεμβράνη, αλλά εξαιτίας της «βίαιης» δράσης τους, αποτυγχάνουν κατά κανόνα να διατηρήσουν την αναδίπλωση της πρωτεΐνης, οπότε και προτιμώνται όταν η διατήρηση της σωστής αναδίπλωσης της πρωτεΐνης δεν αποτελεί προαπαιτούμενο για τις μετέπειτα τεχνικές. Σε αυτή τη κατηγορία ανήκει το SDS (sodium dodecyl sulfate) και το NLS (N-lauroylsarcosine).

Τα μη ιοντικά επιφανειοενεργά είναι τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα για την απομόνωση και τις μελέτες της δομής/λειτουργίας μίας διαμεμβρανικής πρωτεΐνης. Είναι ήπια κατά την απομόνωση των πρωτεϊνών, και δεν καταστρέφουν την αναδίπλωσή τους. Τέτοια επιφανειοενεργά είναι το DDM (n-dodecyl-β-d-maltoside), το DM (n-decyl-β-d-maltoside) και το OG (n-octyl-β-d-glucopyranoside), με το πλέον χρησιμοποιούμενο να είναι το DDM. Παρόλα αυτά, εξαιτίας των μεγάλων μικκυλίων που σχηματίζει, πιθανώς να μην είναι κατάλληλο για μελέτες κρυσταλλογραφίας.

Μια άλλη κατηγορία επιφανειοενεργών αποτελούν τα επαμφοτερίζοντα επιφανειοενεργά (zwitterionic detergents) των οποίων η δραστικότητα στην απομόνωση της πρωτεΐνης από τη μεμβράνη κατατάσσεται μεταξύ των ιονικών και μη ιονικών επιφανειοενεργών. Αυτά τα επιφανειοενεργά, όπως είναι το Fos14 (fos-choline-14), έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως, καθώς δε διαταράσσουν την αναδίπλωση της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης και επιπλέον, τα υδατοδιαλυτά μικκύλια που σχηματίζουν διατηρούν την πρωτεΐνη σε σταθερή και διαλυτή μορφή, ούτως ώστε να

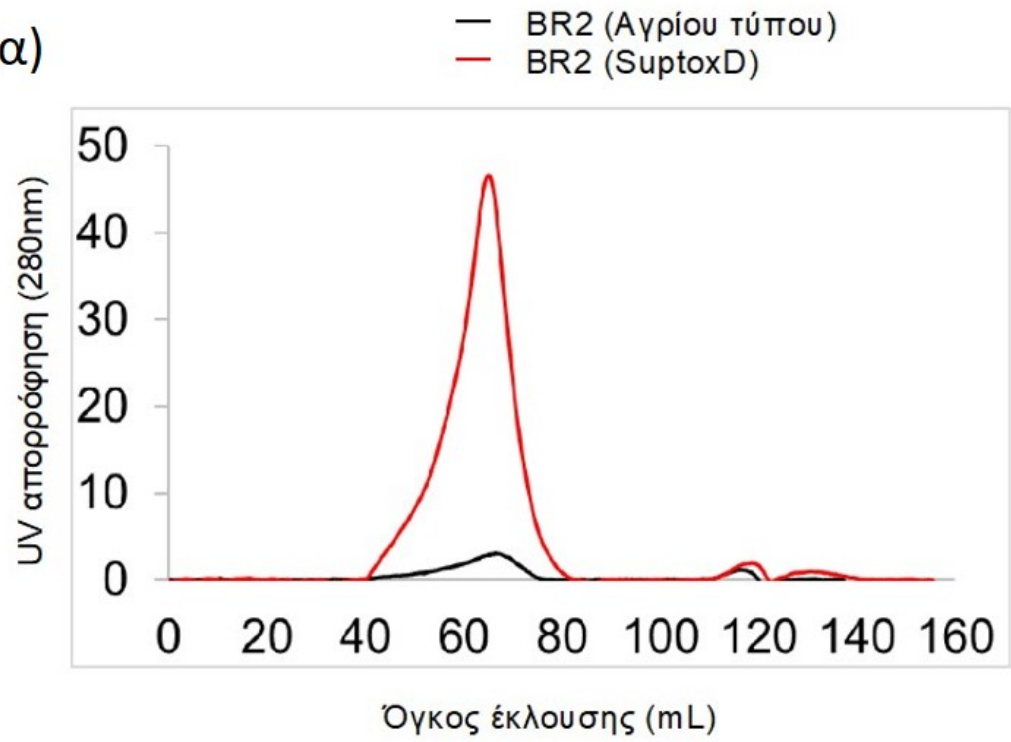
μπορέσει να καθαριστεί περαιτέρω και να χρησιμοποιηθεί για δομικές και λειτουργικές μελέτες.

Προκειμένου να προσδιορίσουμε τις αποδόσεις απομονωμένης διαμεμβρανικής πρωτεΐνης που μπορούμε να έχουμε μετά από την παραγωγή στα στελέχη SuptoxD και SuptoxR υπό τις βέλτιστες συνθήκες, χρησιμοποιήσαμε δύο διαφορετικές πρωτεΐνες. Στο βακτηριακό στέλεχος SuptoxD παράξαμε τον υποδοχέα της βραδυκινίνης 2 (BR2), και στο στέλεχος SuptoxR το ιοντικό κανάλι MscL, το οποίο διέφερε όμως από αυτό του αγρίου τύπου, καθώς στη θέση 88 έφερε το αμινοξύ κυστεΐνη αντί του αμινοξέος φαινυλαλανίνη που βρίσκεται κανονικά (MscL (F88C)). Και οι δύο μεμβρανικές πρωτεΐνες, BR2 και MscL(F88C) έφεραν επίτοπο ιστιδίνης (6xHIS) στο καρβοξυτελικό τους άκρο προκειμένου να μπορούν να απομονωθούν με χρωματογραφία συγγένειας.

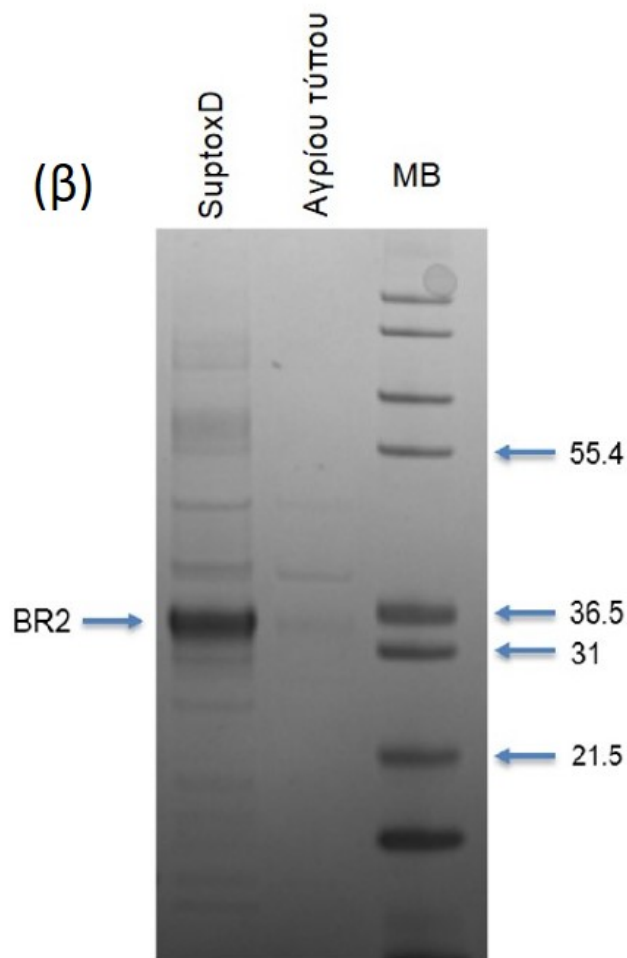
Και οι δύο πρωτεΐνες εξήχθησαν από τις μεμβράνες των κυττάρων με τη χρήση επιφανειοενεργών: στη περίπτωση της BR2 χρησιμοποιήθηκε το επιφανειοενεργό Fos14, ενώ για την MscL (F88C) το επιφανειοενεργό DDM. Μετά το πέρας της διαδικασίας αυτής, ακολούθησε απομόνωση των πρωτεϊνών με χρήση χρωματογραφίας συγγένειας και συγκεκριμένα με στήλη ιόντων μετάλλου (νικελίου) (Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography, IMAC), και στη συνέχεια χρωματογραφία μοριακής διήθησης (Size Exclusion Chromatography, SEC). Έχοντας ως δείγματα-μάρτυρα (control) τις πρωτεΐνες BR2 και MscL (F88C) που είχαν παραχθεί σε κύτταρα αγρίου τύπου και είχαν απομονωθεί με τον ίδιο ακριβώς τρόπο, προχωρήσαμε στον προσδιορισμό της απόδοσης κάθε πρωτεΐνης όταν παράγεται στα στελέχη SuptoxD (BR2) ή SuptoxR (MscL F88C), συγκριτικά πάντα με την παραγωγή της καθεμίας εξ αυτών όταν παράγεται σε κύτταρα αγρίου τύπου. Η απόδοση της

απομονωμένης πρωτεΐνης BR2, όταν αυτή παράχθηκε στο στέλεχος SuptoxD, υπολογίστηκε να είναι περίπου 1 mg ανά λίτρο βακτηριακής καλλιέργειας σε κωνική φιάλη. Αυτή η συγκέντρωση ήταν περίπου 14 φορές υψηλότερη από τη συγκέντρωση της BR2 όταν αυτή παράγεται σε κύτταρα αγρίου τύπου. Επιπλέον, η πρωτεΐνη BR2 από το στέλεχος SuptoxD εκλούστηκε ως μονή κορυφή κατά τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης, γεγονός που σημαίνει πως στο διάλυμα DDM, η καθαρή πρωτεΐνη BR2 βρίσκεται σε αναδιπλωμένη και μη συσσωματωμένη μορφή (Σχήμα 28α). Η επαρκής καθαρότητα των κορυφών που δημιουργήθηκαν κατά τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης προσδιορίστηκαν με ανάλυση με SDS-PAGE (Σχήμα 28β). Κατά την ανάλυση αυτή, εμφανίστηκε μια έντονη ζώνη στην περίπτωση της καθαρής πρωτεΐνης BR2 από το στέλεχος SuptoxD, η οποία αντιστοιχεί στο αναμενόμενο μοριακό της μέγεθος (περίπου 35 kDa) (πίνακας 1, Κεφάλαιο 8). Σε αυτό το σημείο πρέπει να ειπωθεί πως είναι εξαιρετικά σύνηθες για τις απομονωμένες μεμβρανικές πρωτεΐνες, και μάλιστα για τη BR2 συγκεκριμένα¹³⁵, να εμφανίζουν μεγαλύτερη ηλεκτροφορητική κινητικότητα κατά την ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες⁷⁶. Η τελική επιβεβαίωση για τη σωστή ταυτοποίηση της BR2 έγινε μετά την ανάλυση με ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blot), πέψη της πρωτεΐνης με θρυψίνη, και φασματομετρία μάζας (Σχήμα 29 α, β, γ).

(α)

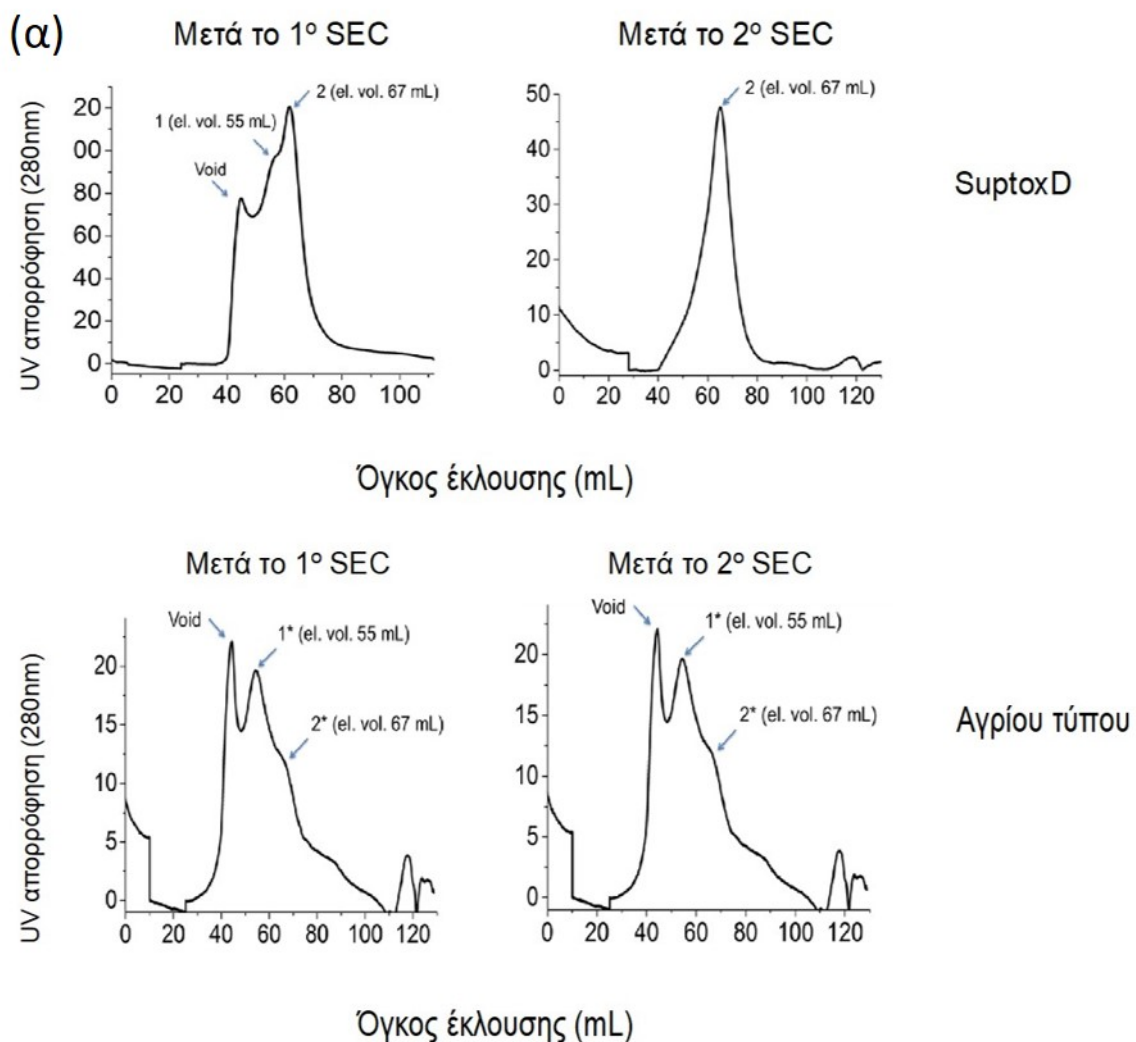


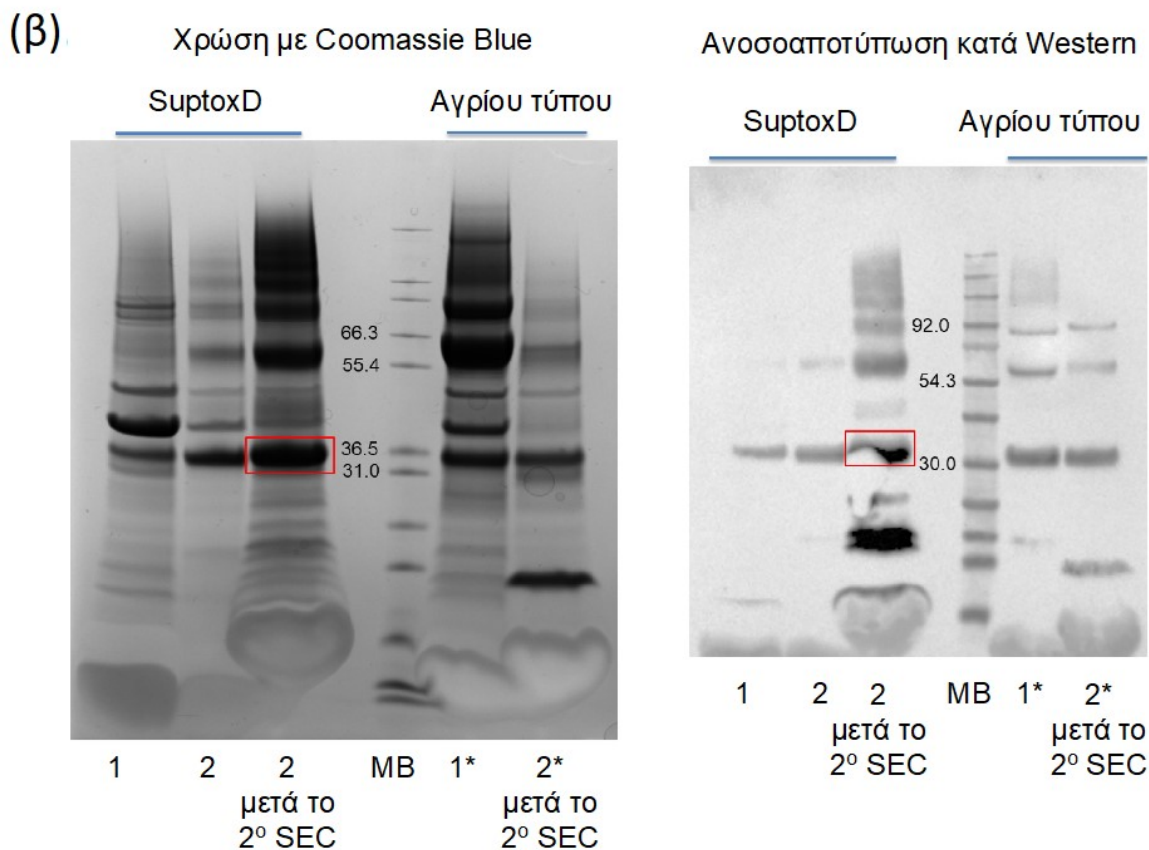
(β)



Σχήμα 28: Το στελέχος SuptoxD παράγει εξαιρετικά υψηλά ποσά απομονωμένης διαμεμβρανικής πρωτεΐνης.

(α) Διάγραμμα SEC καθαρής πρωτεΐνης BR2 από κύτταρα αγρίου τύπου (μαύρη γραμμή) και κύτταρα του στελέχους SuptoxD (κόκκινη γραμμή). (β) Ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες, ανάλυση (SDS-PAGE) των κορυφών που διαμορφώθηκαν κατά το SEC (α) (περίπου 67mL σε στήλη Superdex200 16/60 GE). MB: Μοριακό Βάρος. Τα νούμερα υποδεικνύουν το μοριακό μέγεθος των πρωτεϊνών σε kDa. Τα παραπάνω πειράματα διεξήχθησαν σε συνεργασία με τον Χρήστο Πλιώτα και τον Χαράλαμπο Καψάλη, στο Πανεπιστήμιο του St. Andrews. Προσαρμοσμένο σχήμα από Michou et al.¹²⁹





(γ)

1	MFSPWKISMF	LSVREDSVPT	TASFADMLN	VTLQGPTLNG	TFAQSKCPQV
51	EWLWLNNTIQ	PPFLWVLFVL	ATLENIFVLS	VFCLHKSSCT	VAEIYLGNLA
101	AADLILACGL	PFWAITISNN	FDWLFGETLC	RVVNAIISMN	LYSSICFLML
151	VSIDRYLALV	KTMSMGRMRG	VRWAKLYSLV	IWGCTLLLS	PMLVFRTMKE
201	YSDEGHNVT	CVISYPSLIW	EVFTNMLLN	VGFLPLSVI	TFCTMQIMQV
251	LRNNEMQKFK	EQ Q TERRATV	LVLVLLLLFI	ICWLPFQIST	FLDTLHRLGI
301	LSSCQDERII	DVITQIASFM	AYSNSCLNPL	VYVIVGKRFR	KK S WEVYQGV
351	CQKGGCRSEP	IQMENSMTGL	RTSISVERQI	HKLQDWAGSR	QHNNNNNNHH

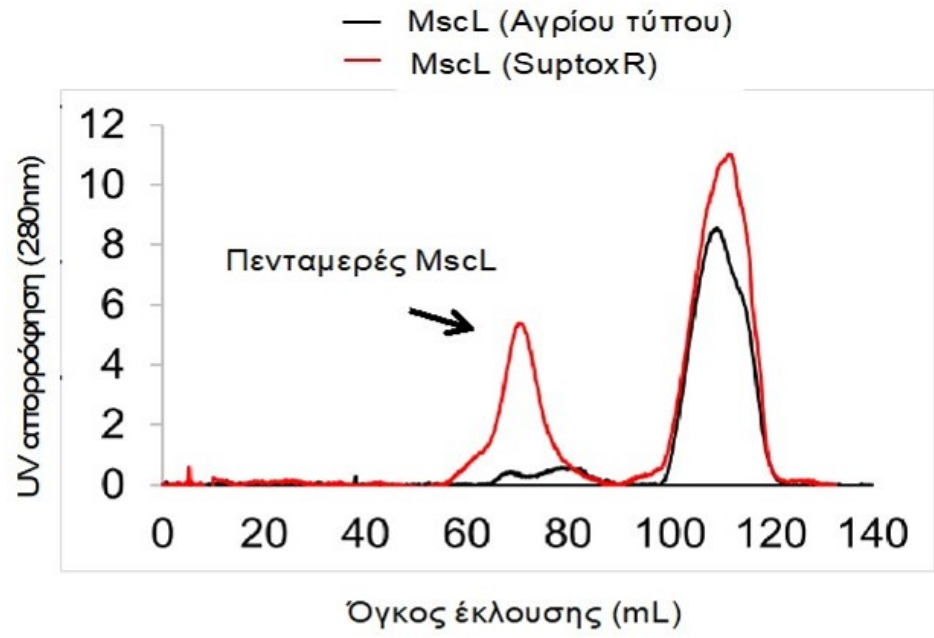
Σχήμα 29: Απομόνωση της πρωτεΐνης BR2 από *E.coli* κύτταρα SuptoxD.

(α) Διάγραμμα SEC καθαρής πρωτεΐνης BR2 από κύτταρα του στελέχους SuptoxD (επάνω) και από κύτταρα αγρίου τύπου (κάτω) μετά από δύο σειριακές φορές καθαρισμού με SEC. (β) Ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες μετά από χρώση με Coomassie blue (αριστερά) και ανοσοαποτύπωση κατά Western (δεξιά) με χρήση του αντισώματος α-His (anti-polyHis) στα δείγματα που εμπεριείχαν οι κορυφές από το SEC που πήραμε από το (α). Οι αναγραφόμενοι αριθμοί αναφέρονται στους αριθμούς των δειγμάτων του (α). MB: Μοριακό Βάρος. Τα νούμερα υποδεικνύουν το μοριακό μέγεθος των πρωτεϊνών σε kDa. (γ)

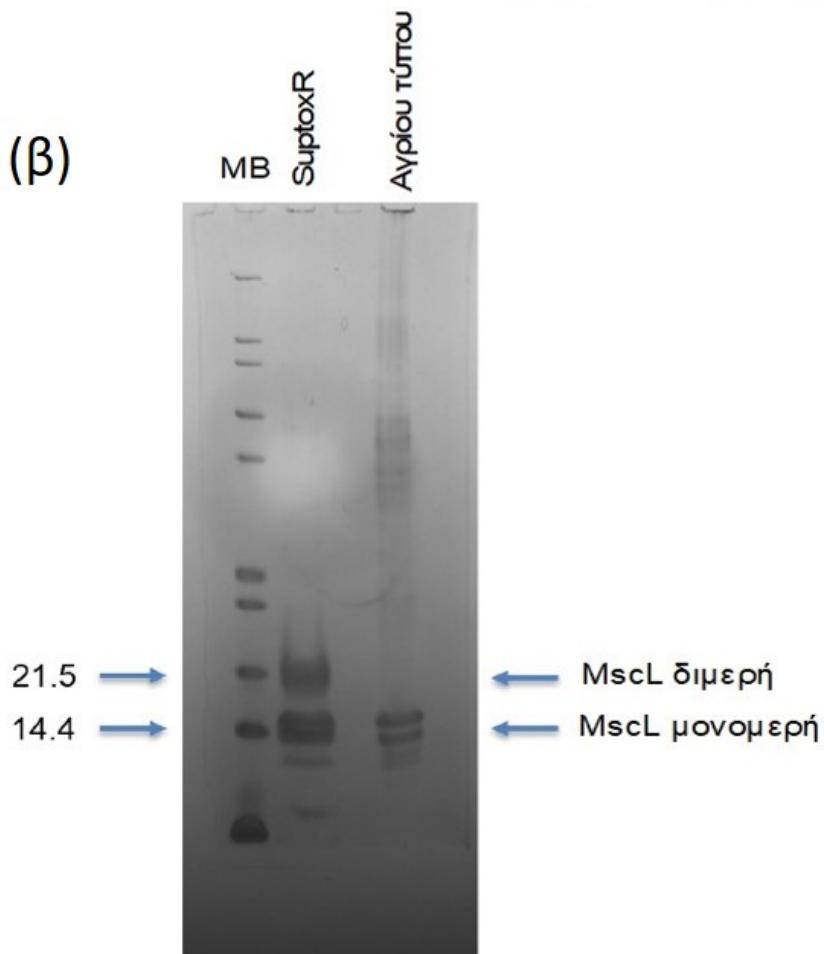
Αποτελέσματα ανάλυσης με φασματοσκοπία μάζας της οποίας προηγήθηκε πέψη της πρωτεΐνης με θρυψίνη, και συγκεκριμένα στις πρωτεϊνικές ζώνες που σημαίνονται με κόκκινο στο (β). Παρουσιάζεται η πλήρους μήκους αμινοξική αλληλουχία της BR2, και τα πεπτίδια που ταυτίζονται σημαίνονται με κόκκινο χρώμα. Κάλυψη της αλληλουχίας της ολικής πρωτεΐνης: 23%. Τα παραπάνω πειράματα διεξήχθησαν σε συνεργασία με τον Χρήστο Πλιώτα και τον Χαράλαμπο Καψάλη, στο Πανεπιστήμιο του St. Andrews. Προσαρμοσμένο σχήμα από Michou et al.¹²⁹

Με ακριβώς τον ίδιο τρόπο, όπως και στην περίπτωση της BR2 από το SuptoxD, παρήχθη και καθαρίστηκε η πρωτεΐνη MscL (F88C) από το SuptoxR (Σχήμα 30α). Η απόδοση της απομονωμένης και καθαρής πρωτεΐνης MscL (F88C), όταν αυτή παράγεται στο στέλεχος SuptoxR, υπολογίστηκε να είναι περίπου 0.33 mg ανά λίτρο βακτηριακής καλλιέργειας σε κωνική φιάλη. Αυτή η απόδοση ήταν περίπου 10 φορές υψηλότερη από τη συγκέντρωση της όταν αυτή παράγεται σε κύτταρα αγρίου τύπου (0.03 mg/L). Και σε αυτή την περίπτωση, η πρωτεΐνη MscL(F88C) από το στέλεχος SuptoxR εκλούστηκε ως μονή κορυφή κατά τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης, είναι καθαρή, σωστά αναδιπλωμένη και σε κατάσταση μονοδιασποράς. Όπως και για τη BR2, ακολούθησε ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE) (Σχήμα 30β), ανάλυση με ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blot), πέψη της πρωτεΐνης με θρυψίνη, και φασματομετρία μάζας (mass spectrometry) (Σχήμα 31).

(α)



(β)



Σχήμα 30: Το στέλεχος SuptoxR παράγει εξαιρετικά υψηλά ποσά απομονωμένης διαμεμβρανικής πρωτεΐνης.

(α) Διάγραμμα SEC καθαρής πρωτεΐνης MscL από κύτταρα αγρίου τύπου (μαύρη γραμμή) και κύτταρα του στελέχους SuptoxR (κόκκινη γραμμή), όπου φαίνεται μία μονή, ομοιογενής και σε κατάσταση μονοδιασποράς κορυφής των πενταμερών MscL. (β) Ανάλυση σε πήκτη πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες, ανάλυση (SDS-PAGE) των κορυφών που διαμορφώθηκαν κατά το SEC (α) του πενταμερούς MscL (F88C). Το τζελ υποδεικνύει τη παρουσία υψηλής καθαρότητας πρωτεΐνη, η οποία περιέχει μόνο MscL(F88C) μονομερή και διμερή συνδεδεμένα μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Η κυστεΐνη στη θέση 88 (F88C) βρίσκεται στην επιφάνεια των δύο γειτονικών υπομονάδων. MB: Μοριακό Βάρος. Τα νούμερα υποδεικνύουν το μοριακό μέγεθος των πρωτεϊνών σε kDa. Τα παραπάνω πειράματα διεξήχθησαν σε συνεργασία με τον Χρήστο Πλιώτα και τον Χαράλαμπο Καψάλη, στο Πανεπιστήμιο του St. Andrews. Προσαρμοσμένο σχήμα από Michou et al.¹²⁹

Πάνω ζώνη (Διμερές MscL)

```
1 MLKGFKEFLA RGNIVDLAVA VVIGTAFTAL VTKFTDSIIT PLINRIGVNA
51 QSDVGILRIG IGGGQTIDLN VLLSAAINFF LIAFAVCFLV VLPYNTLRKK
101 GEVEQPGDTQ VLLTEIRDL LAQTNGDSPG RHGGRGTPSP TDGPRASTES
151 QLEHHHHHH
```

Κάτω ζώνη (Μονομερές MscL)

```
1 MLKGFKEFLA RGNIVDLAVA VVIGTAFTAL VTKFTDSIIT PLINRIGVNA
51 QSDVGILRIG IGGGQTIDLN VLLSAAINFF LIAFAVCFLV VLPYNTLRKK
101 GEVEQPGDTQ VLLTEIRDL LAQTNGDSPG RHGGRGTPSP TDGPRASTES
151 QLEHHHHHH
```

Σχήμα 31: Απομόνωση της MscL από *E. coli* κύτταρα SuptoxR.

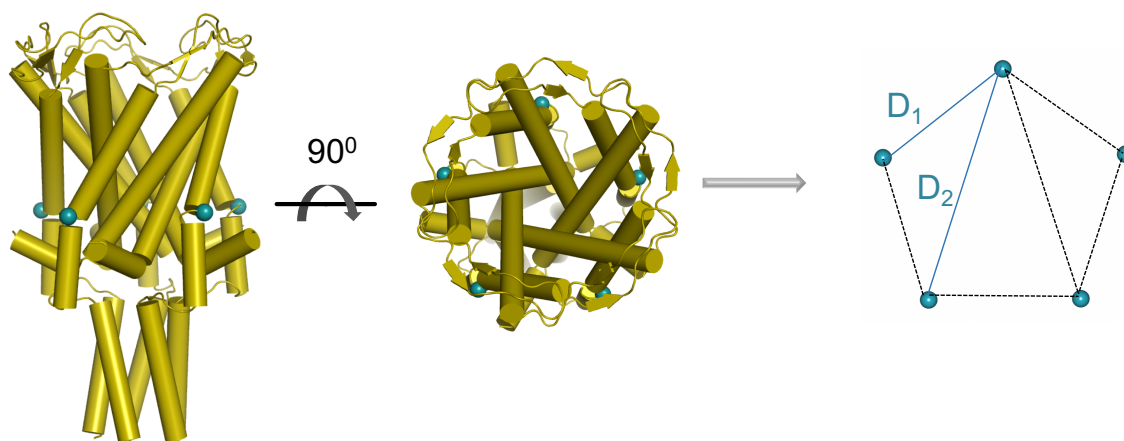
Αποτελέσματα ανάλυσης με φασματοσκοπία μάζας της οποίας προηγήθηκε πέψη της απομονωμένης πρωτεΐνης με θρυψίνη, και συγκεκριμένα στη πάνω πρωτεϊνική ζώνη, δηλαδή στα διμερή (Σχήμα 21β), καθώς και στην κάτω πρωτεϊνική ζώνη, δηλαδή στο μονομερές (Σχήμα 21β) Παρουσιάζεται η πλήρους μήκους αμινοξική αλληλουχία της MscL, και τα πεπτιδία που ταυτίζονται σημαίνονται με κόκκινο χρώμα. Κάλυψη της αλληλουχίας της ολικής πρωτεΐνης: 35% για την επάνω πρωτεϊνική ζώνη και 69% για την κάτω πρωτεϊνική ζώνη. Τα παραπάνω πειράματα διεξήχθησαν σε συνεργασία με τον Χρήστο Πλιώτα και τον Χαράλαμπο Καψάλη, στο Πανεπιστήμιο του St. Andrews. Προσαρμοσμένο σχήμα από Michou et al.¹²⁹

Ως επακόλουθο της ανάλυσης αυτής και αποσκοπώντας στο να προσδιοριστεί η ολιγομερής κατάσταση και η διαμόρφωση της MscL (F88C) από το στέλεχος SuptoxR στο διάλυμα επιφανειοενεργού όπου βρισκόταν, ακολούθησε ανάλυση μέσω φασματοσκοπίας διπλού συντονισμού ηλεκτρονίων-ηλεκτρονίων (DEER ή PELDOR) μετά από σημειακή στόχευση με σήματα ιδιοστροφορμής (σπιν) (site-directed spin labeling, SDSL). Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για την εξέταση της δυναμικής και της τοπικής δευτεροταγούς δομής σε συγκεκριμένες θέσεις κυστεϊνών¹³⁶⁻¹³⁸. Αυτός ήταν και ο λόγος που εξαρχής χρησιμοποιήθηκε η μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης MscL(F88C), αντί της κανονικής μορφής, καθώς όπως ήδη ειπώθηκε, στη θέση 88 έφερε το αμινοξύ κυστεΐνη αντί του αμινοξέος φαινυλαλανίνη που βρίσκεται κανονικά.

Η τεχνική PELDOR επιτρέπει τη μέτρηση αποστάσεων μεταξύ παραμαγνητικών μορίων (που φέρουν μη-ζευγοποιημένων ηλεκτρονίων), που έχουν δημιουργηθεί για αυτόν τον σκοπό, μέσα σε πρωτεϊνικά σύμπλοκα, μεταξύ 1.5 και 7 νανομέτρων (nm) και ανεξαρτήτως μεγέθους. Αυτή η τεχνική έχει αποδειχθεί ως ένα πολύτιμο εργαλείο για τη μελέτη της διαμόρφωσης, της κατάστασης μονοδιασποράς, και των πολυσύνθετων δυναμικών ποικίλων διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, όπως καναλιών ιόντων, μεταφορέων, αλλά και GPCRs¹³⁹⁻¹⁴⁵. Το αποτέλεσμα της τεχνικής PELDOR στις πρωτεΐνες που μελετήθηκαν, βρέθηκαν να είναι σε πλήρη συμφωνία με μελέτες κρυστάλλαγραφίας ακτίνων X¹⁴⁶.

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί ανάλυση της πρωτεΐνης με την τεχνική PELDOR, πραγματοποιήθηκε σημειακή στόχευση με σήματα ιδιοστροφορμής, μέσω της ένωσης (MTSSL) (S-(2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl)methylmethanesulfonothioate), μετά από πρόσδεσή του στην κυστεΐνη

88 που έφερε η πρωτεΐνη MscL(F88C). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης αυτής έδειξαν πως η πρωτεΐνη MscL, σχηματίζει ένα πενταμερές το οποίο έφερε 5 σήματα ιδιοστροφορμής (σπιν) ανά μακρομόριο. Αναλύοντας τις αποστάσεις που σχηματιζόνταν, διαπιστώσαμε πως δύο διακριτές αποστάσεις δημιουργήθηκαν: η απόσταση 1 (D1) και η απόσταση 2 (D2), επιτρέποντας έτσι τον προσδιορισμό της διαμόρφωσης και της κατάστασης της πρωτεΐνης MscL ως ολιγομερές εντός του διαλύματος επιφανειοενεργού όπου βρισκόταν. Μετά την ανάλυση των αποτελεσμάτων που πήραμε από το PELDOR, έγινε εφικτός ο καθορισμός, σε μεγάλη ακρίβεια, των αποστάσεων 1 και 2 (D1/D2) (Σχήμα 32).



Σχήμα 32: Το στέλεχος SuptoxR παράγει σωστά αναδιπλωμένη διαμεμβρανική πρωτεΐνη MscL στην αναμενόμενη ολιγομερή διαμόρφωση.

Διαφορετικές όψεις του πόρου του καναλιού MscL. Η πενταμερής πρωτεΐνη MscL (F88C) σημαίνεται με 5 σήματα ιδιοστροφορμής που οδηγούν σε μία πενταμερή συμμετρία, κι έτσι σε δύο αναμενόμενες αποστάσεις στο PELDOR/DEER. Τα παραπάνω πειράματα διεξήχθησαν σε συνεργασία με τον Χρήστο Πλιώτα και τον Χαράλαμπο Καψάλη, στο Πανεπιστήμιο του St. Andrews. Προσαρμοσμένο σχήμα από Michou et al.¹²⁹

Οι αποστάσεις βρέθηκε πως είναι σε πλήρη συμφωνία με τις αποστάσεις που δημιουργούνται στην κλειστή δομή της πενταμερούς διαμόρφωσης της MscL, όπως έχει αποδειχθεί με την απόκτηση της κρυσταλλικής δομής της συγκεκριμένης πρωτεΐνης (PDB 2OAR)¹⁴⁷. Τα αποτελέσματα της ανάλυσής μας επιβεβαίωσαν πως η πρωτεΐνη MscL που έχει προέλθει από το στέλεχος SuptoxR, είναι σωστά αναδιπλωμένη, δομικά άρτια, καθώς επίσης, σχηματίζει, σε κλειστή δομή, ένα συμμετρικό πενταμερές, το οποίο αναλύθηκε περαιτέρω και βρέθηκε πως ο λόγος μεταξύ των αποστάσεων D2/D1 ισούται περίπου με 1,6, καθιστώντας το έτσι, ως το άψογα συμμετρικό πενταμερές^{129, 136}.

Κεφάλαιο 5 - Κατασκευή βελτιωμένου στελέχους *E. coli* SuptoxD 2^{ης} γενιάς (SuptoxD2.0)

5.1 Προσέγγιση κατασκευής βελτιωμένου στελέχους *E. coli* SuptoxD στελέχους 2^{ης} γενιάς

Έχοντας βελτιστοποιήσει την παραγωγικότητα του στελέχους SuptoxD σε ανασυνδυασμένες μεμβρανοπρωτεΐνες, θελήσαμε να διερευνήσουμε αν Dj1A πρωτεΐνες προερχόμενες από άλλους οργανισμούς μπορούσαν να έχουν παρόμοιες ευεργετικές δράσεις με την πρωτεΐνη Dj1A του οργανισμού *E. coli* (στέλεχος SuptoxD) στην αντιμετώπιση της κυτταροτοξικότητας και την παραγωγή αυξημένων ποσοτήτων διαμεμβρανικής πρωτεΐνης και, εάν ναι, να διερευνήσουμε αν κάποια εξ αυτών των Dj1A πρωτεϊνών παρουσίαζε ακόμα πιο βελτιωμένες ιδιότητες.

5.2 Επιλογή ομόλογων πρωτεϊνών της *E. coli* Dj1A για περαιτέρω μελέτη

Η Dj1A, όπως αναλύθηκε εκτενώς, αποτελεί μία J-πρωτεΐνη, με τη J υπομονάδα της να εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης (C-terminus). Όπως κι οι υπόλοιπες πρωτεΐνες που ανήκουν στην ίδια κατηγορία, διαθέτει άλλα δύο τμήματα: ένα αμινοτελικό (N-terminal) διαμεμβρανικό τμήμα (TMD), και (ii) ένα κεντρικό τμήμα (central domain). Όπως γνωρίζουμε από προηγούμενες μελέτες

μας, μία πλήρους μήκους και συνδεδεμένη με τη μεμβράνη πρωτεΐνη DjlA απαιτείται για την ευεργετική δράση της στην καταστολή της τοξικότητας και στην υπερέκφραση των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών¹⁰⁷. Συνεπώς, όπως γίνεται αντιληπτό, κάθε τμήμα αυτής της πρωτεΐνης έχει έναν ή και περισσότερους πολύ σημαντικούς ρόλους, τόσο για την εύρυθμη λειτουργία του οργανισμού, όσο και για την επιτυχή υπερέκφραση μεμβρανοπρωτεϊνών. Σύμφωνα με μία πρόσφατη μελέτη που διεξήχθη σε 1709 διαφορετικά βακτηριακά γονιδιώματα, το μεγαλύτερο ποσοστό J-πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν ανήκαν στην ομάδα 3 (όπως και η DjlA), με πρωταγωνιστικό ρόλο να κατέχει η DjlA καθώς ήταν παρούσα στο 25% αυτών των γονιδιωμάτων. Τα γονιδιώματα αυτά ανήκαν σε ποικίλες κατηγορίες διαφορετικών βακτηρίων, όπως είναι τα γ-πρωτεοβακτήρια, τα α-πρωτεοβακτήρια κ.α. Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός πως σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις, η DjlA συνοδεύεται από μία J-πρωτεΐνη που ανήκε στην ομάδα 1 (όπως η DnaJ), καθώς κι από την DnaK¹⁴⁸.

Έχοντας υπόψιν πως η πρωτεΐνη DjlA απαντάται μόνο σε παθογόνα βακτήρια, όπως είναι τα *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis*, και *Pseudomonas aeruginosa*¹⁰⁸ κ.α. αναρωτηθήκαμε αν μία ομόλογη, φυσικώς απαντώμενη, DjlA από κάποιο άλλο βακτήριο, θα μπορούσε να αντιμετωπίσει επιτυχώς την τοξικότητα που προκαλείται κατά την υπερέκφραση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, και πιθανώς και έχει και ευεργετικές ιδιότητες στην επιτυχή παραγωγή διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, με παρόμοιο τρόπο όπως κι η πρωτεΐνη *E. coli* DjlA.

Υπό αυτή τη σκέψη, πραγματοποιήθηκε αναζήτηση στη βιβλιογραφία και σε βάσεις δεδομένων όπως η NCBI BLAST¹⁴⁹ για την εύρεση βακτηριακών γονιδιωμάτων που να κωδικοποιούν φυσικές παραλλαγές τη συγκεκριμένης πρωτεΐνης. Σκοπό μας αποτελούσε η εύρεση ομόλογων πρωτεϊνών της *E. coli* DjlA,

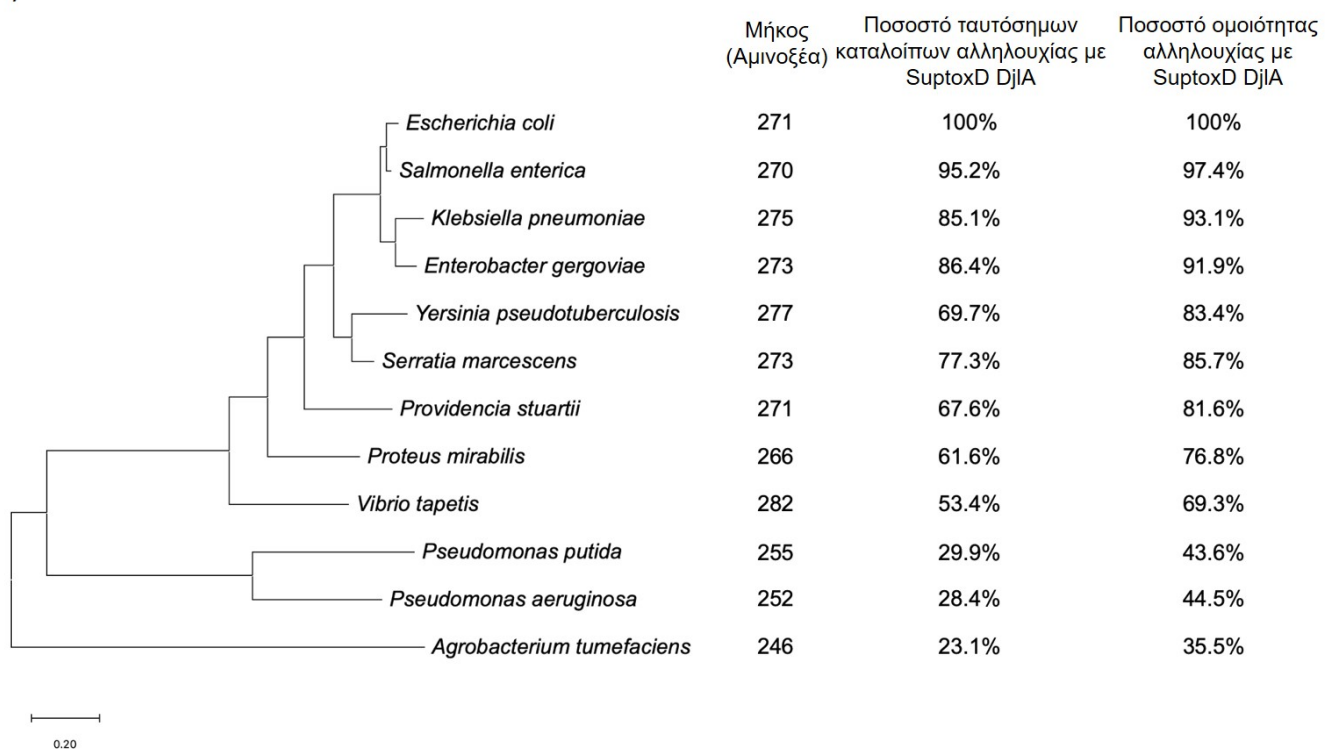
με κλιμακούμενα ποσοστά ομοιότητας, που προέρχονταν από βακτήρια διαφορετικής προελεύσεως, προκειμένου να μελετήσουμε μία ποικιλία πρωτεϊνών Dj1A στη δράση τους κατά της κυτταροτοξικότητας στο βακτήριο *E. coli*¹⁵⁰.

Μετά την εύρεση των διαφορετικών παθογόνων βακτηρίων, προβήκαμε στη στοίχιση των πρωτεϊνικών Dj1A αλληλουχιών που αυτά έφεραν, μέσω των προγραμμάτων Clustal Omega and ESPript. Όπως φαίνεται στο σχήμα 33α, οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες χωρίζονταν σε 3 ομάδες: μία ομάδα με υψηλό ποσοστό αμινοξικής ομοιότητας (85%), μία 2^η ομάδα με μεσαίο ποσοστό αμινοξικής ομοιότητας (60-85%) και τέλος μία 3^η ομάδα που χαρακτηριζόταν από μικρό ποσοστό αμινοξικής ομοιότητας (<60%) με την Dj1A του *E. coli*. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός πως στις ομόλογες πρωτεΐνες Dj1A διακρίνονται αρκετές διαφορές αλλά και ομοιότητες, ως προς τα ιδιαίτερα δομικά χαρακτηριστικά τους που αφορούν στις 3 υπομονάδες που φέρει μία J-πρωτεΐνη, όπως η Dj1A. Συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη ετερογένεια στην αμινοξική ακολουθία παρατηρείται στο κεντρικό τμήμα άγνωστης λειτουργίας της πρωτεΐνης (central domain), όπου οι επιλεγμένες προς μελέτη, ομόλογες πρωτεΐνες διέφεραν σημαντικά και στο μήκος του. Αμινοξική ετερογένεια παρατηρήθηκε και στο αμινοτελικό (N-terminal) διαμεμβρανικό τμήμα (TMD) των επιλεγμένων πρωτεϊνών, αλλά σε μικρότερο βαθμό συγκριτικά με αυτήν του κεντρικού τμήματος. Παρόλα αυτά, όλες οι εξεταζόμενες ομόλογες πρωτεΐνες διαθέτουν το συντηρημένο μοτίβο GxxxG που έχει παρατηρηθεί, εκτός από τα συγκεκριμένα βακτήρια, και σε άλλα όπως το *Haemophilus influenza*, το *Coxiella burnetti* κ.α. Οι παρατηρήσεις αυτές προκαλούν το ενδιαφέρον καθώς το διαμεμβρανικό τμήμα της Dj1A, εκτός του ότι μετέχει στο διμερισμό της πρωτεΐνης, στην τοποθέτηση αυτής στην μεμβράνη, καθώς και εμπλέκεται στην ενεργοποίηση

της αντίδρασης στρες Rcs, φαίνεται, σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες μας, να κατέχει πολύ σημαντικό ρόλο στην επιτυχή υπερέκφραση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, καθώς πιθανότατα, μέσω αυτού, να αλληλεπιδρά η Dj1A με αυτές.

Όσον αφορά στο καρβοξυτελικό τμήμα (C-terminal) όπου και εδράζεται η J υπομονάδα, παρατηρείται η μεγαλύτερη αμινοξική ομοιότητα μεταξύ των εξεταζόμενων πρωτεϊνικών αλληλουχιών. Σε όλες τις πρωτεΐνες παρατηρείται το συντηρημένο μοτίβο του τριπεπτιδίου HPD, το οποίο κρίνεται ως απαραίτητο για την αλληλεπίδραση της Dj1A με την DnaK. Το γεγονός πως αυτό το τριπεπτίδιο υπάρχει σε όλες τις εξεταζόμενες ομόλογες πρωτεΐνες, όσο μακριά ή κοντά κι αν βρίσκονται αυτές εξελικτικά, τονίζει τη μεγάλη σημασία που έχει η ύπαρξη του στην εύρυθμη λειτουργία της πρωτεΐνης (Σχήμα 33β).

(α)



(β)

Transmembrane domain Central domain J domain

```
1      10      20      30      40
E. coli      . . . . . M Q Y W G K I I C V A V A L L M G G G F W G V V L G L L I G H M F D K A R S . R K M A W F . . . . .
S. enterica . . . . . M Q Y W G K I I G V A V A L M M G G G F W G V V L G L L V G H M F D K A R S . R K M A W F . . . . .
P. putida    . . . . . M W W P G T V I C V G A G F A V A . S I P G A L L G A L L G Q A I D R R L R L Q G W E D M R R E R L G
P. mirabilis . . . . . M R Y W G K L L G L I I G S F A G I G F W G I V I G V F L G H L Y D V Q R S K L S Y G G . . . . .
Y. pseudotuberculosis . . . . . M R Y W G K L L G L V L G V M Y A P G V V G A L L G L L V G H M V D R A L G A K R R G F F . . . . .
V. tapetis   . . . . . M H I F G K I L G A F F G L L F G . G P L G A M F G L F L G H Q F D K A R R L Q Q A G T T A G G G F
P. aeruginosa . . . . . M L W P A T L I G A G A G W A L A . S I P G A L L G G L L G Q L L D R R L R L E S W R G L L A R L R
A. tumefaciens . . . . . M M F D F A C L Q I S L W E R L L G A I . . . . . G D A A G N A L G R V V E A I R T L . . . . . F
```

```
50      60      70      80      90      100
E. coli      . . A N Q R E R Q A L F F A T T F E V M G H L T K S K G R V T E A D I H I A S Q L M D R M N L H G A S R T A A Q N A F R
S. enterica . . A N Q R E R Q A L F F A T T F E V M G H L T K S K G R V T E A D I H I A S Q L M D R M N L H G D S R T A A Q N A F R
P. putida    G R P A L R D D E . . . . L L F V M L G R L A K C D G R V A E Q H I Q Q A R Q E M V R L D L A E A A R L R A I N A F N
P. mirabilis . . R Y N R D R Q A Y F F A A T T Q V L G H L T K S K G R V T Q T D I T L A S T L M D R M N L H G A A R T A A Q Q A F R
Y. pseudotuberculosis . . A D Q Q T R Q S L F F R T T F Q V M G H L T K A K G R V T E V D I Q L A S Q L M D R M L H G A A R T A A Q Q A F R
V. tapetis   S R A N N T E K Q A E F F R S A F A V M G H V A K A K G Q V T Q E E I Q L A S T M M S R M N L H G E Q R A A A Q N A F R
P. aeruginosa G R A V N D E D D . . . . L L F Q L L G Y L A K S G R V E E M H I R Q A R E E M A L R K L D R R A Q R R A I A S F G
A. tumefaciens E G D P E T R R K V S F S V A I T A L S A K M A K A D G V V N D A E V R A F R Q I F D F P D E E A K N V A R L Y N L A R
```

```
110      120      130      140      150      160
E. coli      V G K S D N Y P L R E K M R Q F R S V C F G R F D L I R M F L E I Q I Q A A F A D G S L H P N E R A V L Y V I A E E L G
S. enterica V G K A D N Y P L R E K M R Q F R S V C F G R F D L I R M F L E I Q I Q A A F A D G S L H P N E R E V L Y V I A E E L G
P. putida    R G K A G K D R L G G H L R R I S Q P H A A . . . . E G T L R A C W R M V W A D G K M G N K E R E L L D W G Q K L G
P. mirabilis E G K E V D F P L R A T L Q R V R Q I C A G R R D L L Q M F L E I Q L Q A A F A D G Q L H P N E R K M L F I I D E L G
Y. pseudotuberculosis E G K E S H F P L R K T L Q E F R R V C F G R F D L I R I F L E I Q L Q A A F A D G S L H P N E R Q V L Y V I A E E L G
V. tapetis   D G K E T G F P L E E T L Q K V R V S S G G R H D L L Q F F L E L Q I S A A F A D G S L H P S E R D V L H I A Q Q L G
P. aeruginosa K G K A G I A H L Q A E V A R L K G . . E R A . . . . . E A V L L A C W R M A W A G G V L S Q S A R Q L V L Q W G R W L G
A. tumefaciens Q D V A G Y E A Y A E R L A G L C G S G H A N C E M L E S V I D G L F H I A K A D G L I H E R E L A F L G R I A E I F R
```

```
170      180      190      200      210
E. coli      I S R A Q F D Q F L R M M Q G G A Q F G G G . . Y Q Q T G G . . G N W Q Q A Q R G P T L E D A C N V L G V K P T D D
S. enterica I S R V Q F D Q F L R M M Q G G A Q F G G G . . Y H Q Q S G . . . . G G W Q Q A Q R G P T L E D A C N V L G V K T T D D
P. putida    M S R R Q V Q A M S L E Y E P R K A . . . . . T G A E S V P M T Y A A L R L L A V D A D T D
P. mirabilis F S R A R F E H I L A M M Q A G Q S F H Y Q Q G . . . . . Q N Y Q P Q T Q G P T L S D A Y K V L G I K E G D D
Y. pseudotuberculosis I S R G Q F D Q F L R M F D G G R Q F G G H G W Q G Q G G Y S Q S G Y Q R A P Q G P T L E D A C K V L G V N S S D D
V. tapetis   F S S A Q L E Q R L Q M Q E A A F R F Q Q G G G F G . S D G Q G H G G A F K Q A S S A N Q I S D A F K V L G V A E S A E
P. aeruginosa W S A E R T E R L S A R V M P K R T . . . . . R A . . . . V A R D S Y R E A L L L L G V E A G S E
A. tumefaciens I T E D H F E T I M A R . . . . . H V H M D G R D P Y R V L G V S P S D D
```

```
220      230      240      250      260      270
E. coli      A T T I K R A Y R K L M S E H H P D K L V A K G L P P E M M E M A K Q K A Q E I Q Q A Y E L I K Q Q K G F K
S. enterica A T T I K R A Y R K L M S E H H P D K L V A K G L P P E M M E M A K Q K A Q E I Q K A Y E L I K E Q K G F K
P. putida    T D K V K Q A Y R R L V S R H H P D K L A G T G A S E A Q V R E A T A R T R E L H Q A Y A M I R K R R G L .
P. mirabilis V K T I K R A Y R K L M G E H H P D K L V A K G L P P E M M E I A K Q K A Q A I Q V A Y D L I K K E K G F R
Y. pseudotuberculosis S V A I K R A Y R K L M G E H H P D K L V A K G L P P E M M E M A K Q K A Q E I Q A A Y D L I K R E K G F K
V. tapetis   S K E V K R A Y R K L M N E H H P D K L V A K G L P P E M M Q V A K E K A Q E I Q A A Y D L L K K E K G F K
P. aeruginosa P A L I K R A Y R K L I S Q H H P D K L A G A G A S V E R V R A A T E K T R E L Q A A Y A L V R R E E G F R
A. tumefaciens F L D I R K R Y R S L V A E H H P D K L I A R G V P M E L H A A A N E R M A A L N A A Y A A I E K E R R V A
```

Σχήμα 33: Συγκριτική ανάλυση των αμινοξικών αλληλουχιών όλων των εξεταζόμενων ομόλογων, με την *E. coli* DjlA, πρωτεϊνών.

(α) Φυλογενετική ανάλυση όλων των ομόλογων βακτηριακών DjlA πρωτεϊνών και ανάλυση των ποσοστών ομοιότητας της αμινοξικής τους ακολουθίας με αυτήν της *E. coli* DjlA. Οι εξελικτικές σχέσεις των ειδών πραγματοποιήθηκαν με χρήση της μεθόδου της Ελάχιστης εξέλιξης (Minimum Evolution method). Το φυλογενετικό δένδρο είναι χωρίς ρίζα, και με μήκη κλάδων στις ίδιες μονάδες με τις φυλογενετικές αποστάσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του δένδρου. Οι φυλογενετικές αποστάσεις υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας την μέθοδο διόρθωσης Poisson και οι φυλογενετικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα MEGA X. (β) Πολλαπλή στοίχιση αμινοξικών αλληλουχιών όλων των εξεταζόμενων, ομόλογων με την *E. coli* DjlA, πρωτεϊνών. Τα αμινοξέα τα οποία παρουσιάζουν πλήρη συντήρηση σημαίνονται με κόκκινο χρώμα, και τα λιγότερα συντηρημένα, ανάμεσα στις συγκρινόμενες αλληλουχίες, με κίτρινο χρώμα. Η στοίχιση πραγματοποιήθηκε με χρήση των προγραμμάτων Clustal Omega και ESPript. Προσαρμοσμένο σχήμα από Michou et al.¹⁵⁰

5.3 Σύγκριση της αποτελεσματικότητας φυσικών παραλλαγών της *E. coli* DjlA στο να αντιμετωπίζουν την κυτταροτοξικότητα και να προάγουν την υπερέκφραση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών

Προκειμένου να μπορέσουμε να μελετήσουμε την επίδραση των ομόλογων DjlA πρωτεϊνών στην αντιμετώπιση της κυτταροτοξικότητας που επάγεται από την υπερέκφραση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, προβήκαμε στην κλωνοποίηση των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες αυτές. Έτσι, ενισχύσαμε για κάθε διαφορετικό ομόλογο, με χρήση των κατάλληλα σχεδιασμένων εκκινήτων, το αντίστοιχο *djlA* γονίδιο είτε από γονιδιωματικό DNA είτε από πλασμιδιακό φορέα που έφερε το *djlA* γονίδιο (όπως στη περίπτωση του *V. tapetis*). Στη συνέχεια, κλωνοποιήσαμε κάθε γονίδιο εντός του πλασμιδιακού φορέα pSuptoxD, αφαιρώντας πρώτα το *E. coli* *djlA* γονίδιο, και τοποθετώντας στη θέση του το ομόλογό του *djlA* γονίδιο κάθε φορά (πίνακας 2, Κεφάλαιο 8). Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί πως οι αλληλουχίες των γονιδίων δεν προσαρμόστηκαν με βάση τα πλέον χρησιμοποιούμενα κωδικόνια του οργανισμού *E. coli* (codon optimization), αλλά διατηρήθηκε η ενδογενής αλληλουχία, όπως αυτή κωδικοποιείται σε κάθε οργανισμό από τον οποίο και προήλθαν.

Για τη διεξαγωγή της πρώτης διερευνητικής σύγκρισης όλων των ομόλογων DjlA πρωτεϊνών στην αντιμετώπιση της κυτταροτοξικότητας και στην επιτυχή υπερέκφραση μεμβρανοπρωτεϊνών, επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί ως μοντέλο ξανά η BR2.

Η ευεργετική επίδραση της συνέκφρασης των ομόλογων με την *E. coli* DjlA, πρωτεϊνών αξιολογήθηκε αρχικά στην αντιμετώπιση της επαγόμενης κυτταροτοξικότητας από την παραγωγή της BR2, παρατηρώντας και μετρώντας την τελική κυτταρική πυκνότητα των καλλιιεργειών μετά το πέρας της διαδικασίας. Όπως φαίνεται στο σχήμα 34, όλες οι εξεταζόμενες DjlA πρωτεΐνες, με εξαίρεση την DjlA από τον οργανισμό *Vibrio tapetis*, παρουσίασαν σημαντική αύξηση της κυτταρικής πυκνότητας των καλλιιεργειών όπου συνεκφράζονται με την BR2, και δρουν ως καταστολείς της κυτταροτοξικότητας. Στη συνέχεια, στις ίδιες καλλιιεργείες, μετρήθηκε κι ο φθορισμός ανά κύτταρο χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής, προκειμένου διαπιστώσουμε εάν αυτές οι ομόλογες πρωτεΐνες προάγουν και την υπερπαραγωγή της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης BR2. Πράγματι, η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε πως η πλειοψηφία των εξεταζόμενων DjlA πρωτεϊνών βοηθά σε μεγάλο βαθμό την επιτυχή παραγωγή της χιμαιρικής πρωτεΐνης BR2-GFP, σημειώνοντας αυξημένα επίπεδα φθορισμού ανά κύτταρο, συγκριτικά με τα κύτταρα αγρίου τύπου. Επιπλέον, μέσω της κυτταρομετρίας ροής διαπιστώθηκε και ομοιογένεια στους πληθυσμούς των κυττάρων. Στην περίπτωση όπου δε χρησιμοποιήθηκε καταστολέας κατά την παραγωγή της BR2-GFP πρωτεΐνης, σχηματίζονται δύο διακριτοί πληθυσμοί, με διαφορετικά επίπεδα φθορισμού. Αυτό εξηγείται πιθανά από το εξής φαινόμενο: Κατά την υπερπαραγωγή της πρωτεΐνης BR2-GFP όπου σημειώνεται υψηλότερη τοξικότητα, κάποια κύτταρα αποβάλλουν το πλασμίδιο που κωδικοποιεί για την παραγωγή της πρωτεΐνης, ενώ κάποια άλλα το διατηρούν. Εξ 'ου και ο σχηματισμός των δυο διαφορετικών πληθυσμών (Σχήμα 35).

Η αυξημένη κυτταρική πυκνότητα που σημειώθηκε, συνδυαστικά με τον ανά κύτταρο αυξημένο φθορισμό, οδηγούν σε μία στατιστικώς σημαντικότερη, συγκριτικά με την απουσία υπερπαραγωγής *djlA* (δείγμα χωρίς καταστολέα), ογκομετρική αύξηση του παρατηρούμενου φθορισμού, σε δείγματα που έχουν προκύψει από ίσο όγκο καλλιέργειας για όλες τις διαφορετικές *DjlA* που δοκιμάστηκαν (Σχήμα 36). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός πως το μέγεθος αυτής της ογκομετρικής αύξησης του φθορισμού ήταν διαφορετικό κατά τη συμπαραγωγή κάθε μίας από τις εξεταζόμενες *DjlA* πρωτεΐνες με την πρωτεΐνη BR2-GFP, και εποίκιλε από σημαντικό (44% για τη *DjlA* που προερχόταν από τον οργανισμό *A. tumefaciens*), έως σε δραματικό βαθμό ((1,000–1,450% για τις *DjlA* που προέρχονταν από τους οργανισμούς *E. coli*, *S. enterica*, *K. pneumoniae*, και *E. gergoviae*).

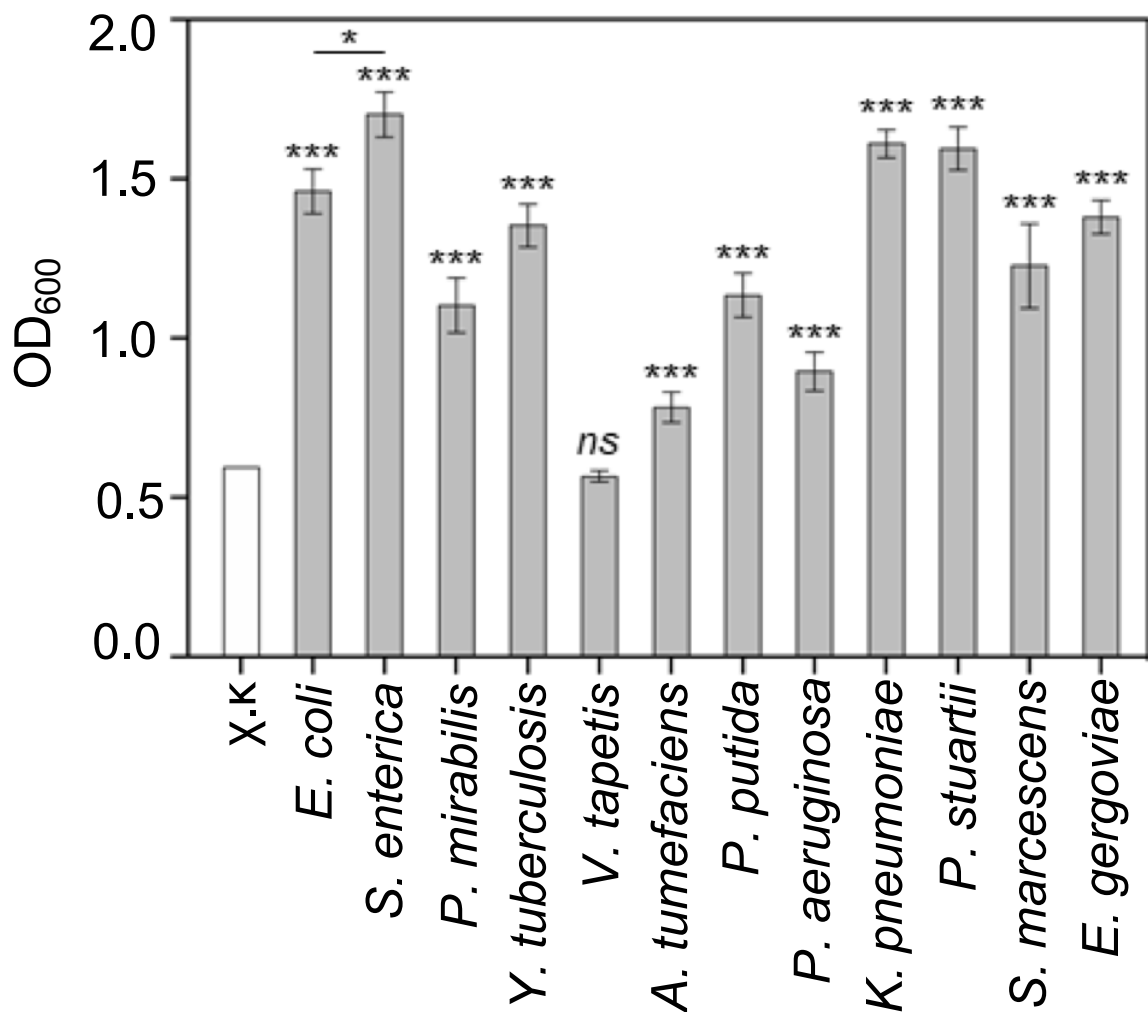
Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε πως η θεαματική ογκομετρική αύξηση του σχετικού φθορισμού που παρατηρήθηκε μετά από τη συμπαραγωγή των διαφορετικών *DjlA* κατά την παραγωγή της χιμαιρικής πρωτεΐνης BR2-GFP προερχόταν από αυξημένη παραγωγή, ενσωματωμένης στη μεμβράνη, πρωτεΐνης, προβήκαμε στην απομόνωση πρωτεΐνης. Έτσι, απομονώθηκαν μεμβράνες από ίσο όγκο καλλιιεργειών 500 mL μετά το πέρας της διαδικασίας υπερέκφρασης, ομογενοποιήθηκαν και ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες, καθώς και ανάλυση μετά από ανοσοαποτύπωση κατά Western (Σχήμα 37). Όπως γίνεται αντιληπτό μετά την ανάλυση των πρωτεϊνών που παρήχθησαν υπό τις ίδιες συνθήκες, χρησιμοποιώντας σε κάθε περίπτωση διαφορετική ομόλογη της *E. coli* *DjlA* πρωτεΐνη *DjlA*, και συγκρίνοντας με τα δείγματα που δεν περιείχαν πρωτεΐνη-καταστολέα *DjlA*,

διακρίνονται σημαντικές διαφορές. Όταν γίνεται χρήση των πρωτεϊνών Dj1A που προέρχονται από τους οργανισμούς *S. enterica*, *P. mirabilis*, *Y. tuberculosis*, διαπιστώνεται αυξημένη παραγωγή της χημιαϊκής πρωτεΐνης BR2-GFP. Επιπλέον, όπως παρατηρείται, η αυξημένη παραγωγή μίας Dj1A πρωτεΐνης (π.χ. της *V. tapetis* Dj1A), η οποία δημιουργεί μία μεγάλη πρωτεϊνική ζώνη, δε συνεπάγεται και την αποτελεσματικότητά της, ούτε καταστέλλοντας την κυτταροτοξικότητα (Σχήμα 34), ούτε συνδράμοντας στην επιτυχή υπερπαραγωγή της πρωτεΐνης BR2-GFP (Σχήμα 35-37).

Οι Dj1A πρωτεΐνες που σημείωσαν τόσο εντυπωσιακά αποτελέσματα, και στην καταστολή της κυτταροτοξικότητας προάγοντας την κυτταρική ανάπτυξη, αλλά και στην παραγωγή αυξημένης ποσότητας, ενσωματωμένης στην μεμβράνη, BR2-GFP πρωτεΐνης, ήταν, κατά κανόνα, αυτές που εμφάνιζαν τα μεγαλύτερα ποσοστά αμινοξικής ομοιότητας με την ενδογενή *E. coli* Dj1A, όπως απορρέει και από την σύγκριση των αμινοξικών αλληλουχιών των διαφορετικών Dj1A που μελετήθηκαν. Επιπλέον, αξιοσημείωτη παρατήρηση αποτελεί το ότι, παρά την μεγάλη απόκλιση στην ομοιότητα των αμινοξικών αλληλουχιών πολλών εξεταζόμενων Dj1A πρωτεϊνών, συγκρινόμενα με την *E. coli* Dj1A, και την εξελικτική απόσταση που τα χωρίζει από αυτή, όταν χρησιμοποιήθηκαν κατά την παραγωγή της πρωτεΐνης BR2-GFP, έδρασαν ως εξαιρετικά αποτελεσματικοί καταστολείς της κυτταροτοξικότητας, καθώς επίσης συνέδραμαν στην επιτυχή υπερπαραγωγή της BR2-GFP.

Όπως διαπιστώθηκε, η χρήση της Dj1A πρωτεΐνης που προέρχεται από τον οργανισμό *S. enterica*: (i) καταστέλλει αποτελεσματικότερα την κυτταροτοξικότητα που προκαλείται κατά την υπερπαραγωγή του υποδοχέα BR2, (ii) βοηθά, σε στατιστικώς σημαντικό βαθμό, την παραγωγή της πρωτεΐνης BR2-GFP συγκριτικά

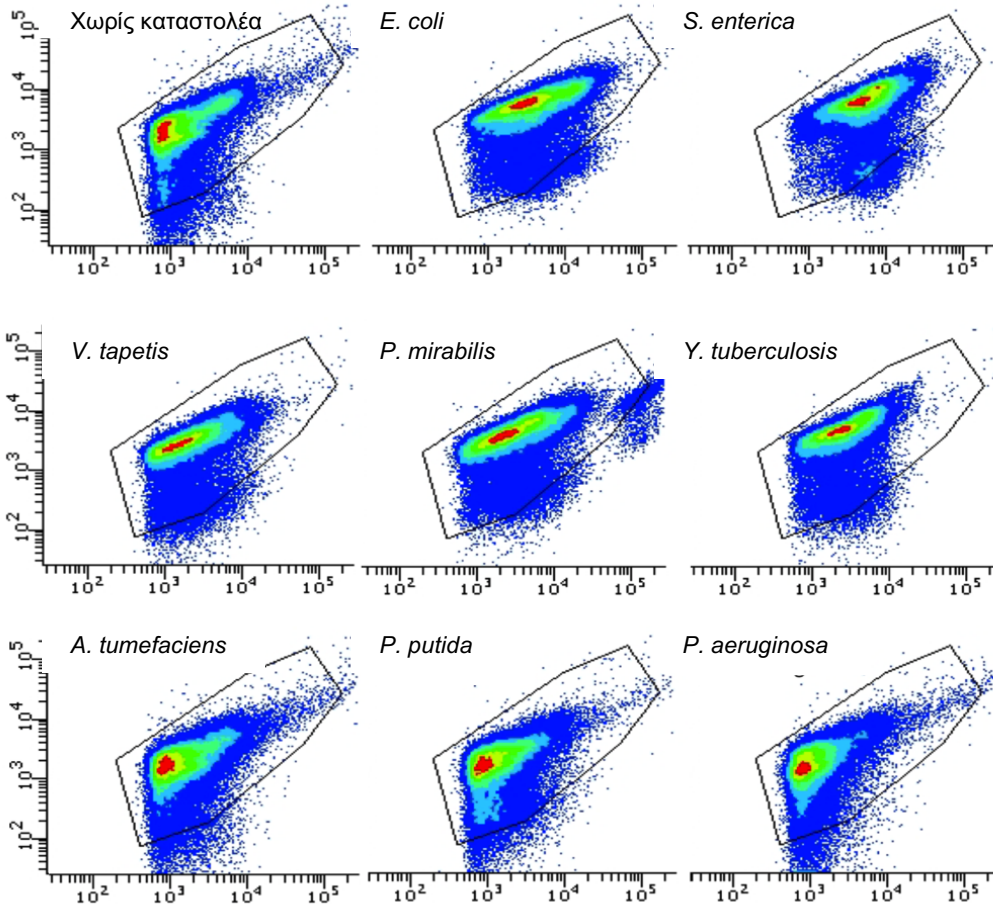
με όταν χρησιμοποιείται η ενδογενής *E. coli* Dj1A, γεγονός το οποίο γίνεται προφανές και από τον ανά κύτταρο φθορισμό που καταγράφηκε μετά από κυτταρομετρία ροής (Σχήμα 35), και από την ογκομετρική αύξηση του παρατηρούμενου φθορισμού (Σχήμα 36), καθώς και από την ανάλυση μετά από ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου η παραγόμενη ζώνη πρωτεΐνης στην περίπτωση της *S. enterica* Dj1A είναι σαφώς μεγαλύτερη συγκριτικά με την παραγόμενη ζώνη πρωτεΐνης στην περίπτωση χρήσης της *E. coli* Dj1A (Σχήμα 37).



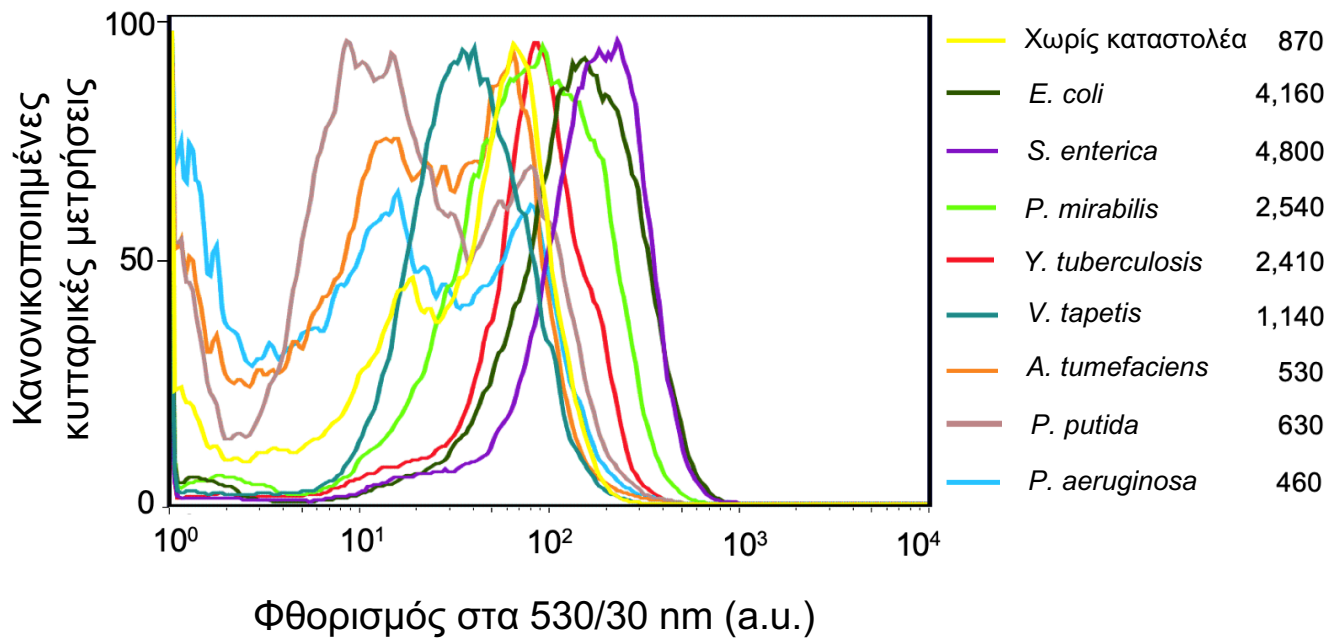
Σχήμα 34: Η πλειοψηφία των ομόλογων, της *E. coli* DjlA, πρωτεϊνών DjlA δρουν αποτελεσματικά ως καταστολείς της κυτταροτοξικότητας, προάγοντας την κυτταρική ανάπτυξη.

Μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 600nm, από ίσο όγκο καλλιέργειας, όπου παράγεται η χιμαιρική πρωτεΐνη BR2-GFP μετά από προσθήκη 0.2 μg/mL aTc και $100 \cdot 10^{-4}$ % w/v L(+) αραβινόζης, για 16 ώρες στους 25 °C. Οι μετρήσεις έχουν πραγματοποιηθεί σε τριπλές καλλιέργειες, τουλάχιστον 3 ανεξάρτητες φορές και τα σφάλματα αντιπροσωπεύουν μία τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή (\pm s.e.m.). Η στατιστική σημαντικότητα αναφέρεται στις διαφορές συγκριτικά με τα δείγματα όπου δεν έχει χρησιμοποιηθεί καταστολέας, και οποιαδήποτε άλλη σύγκριση σημαίνεται με μία μπάρα μεταξύ των δειγμάτων που συγκρίνονται. Προσαρμοσμένο σχήμα από Michou et al.¹⁵⁰

Πλάγια σκέδαση

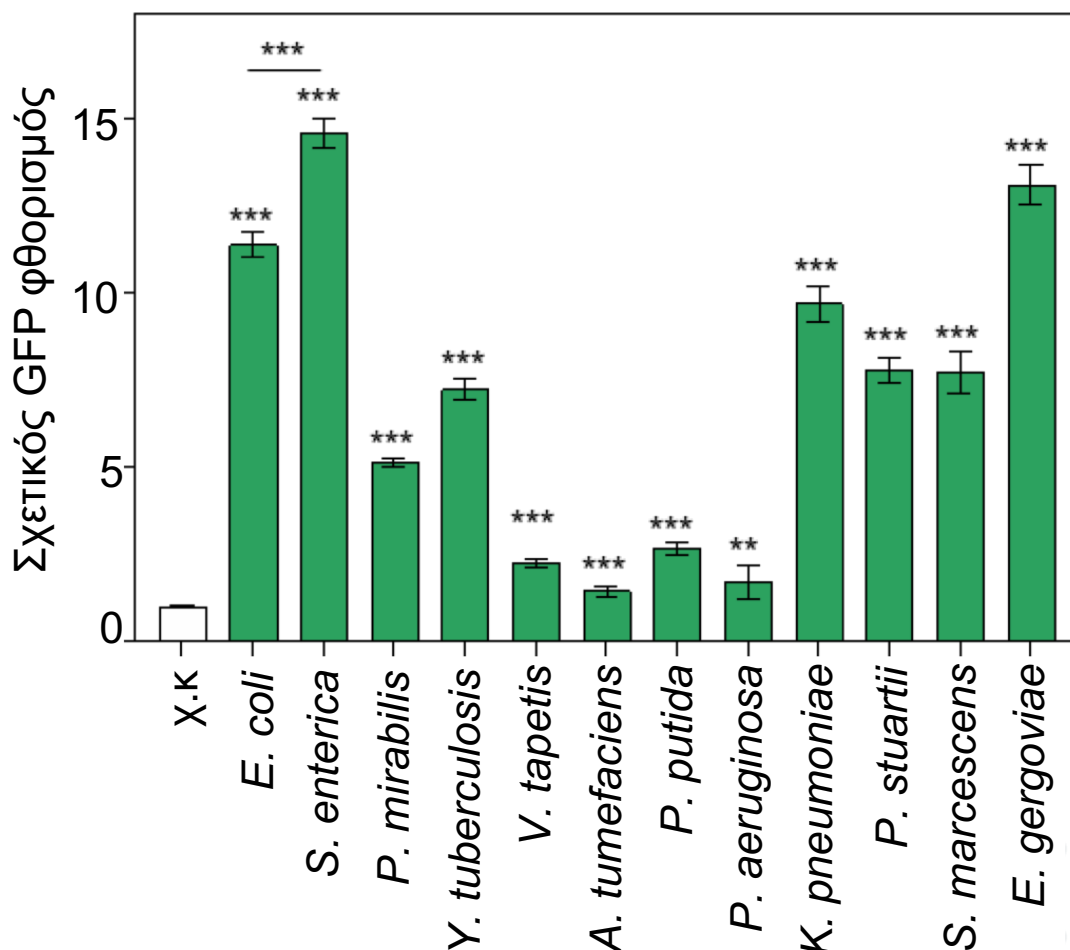


Εμπρόσθια σκέδαση



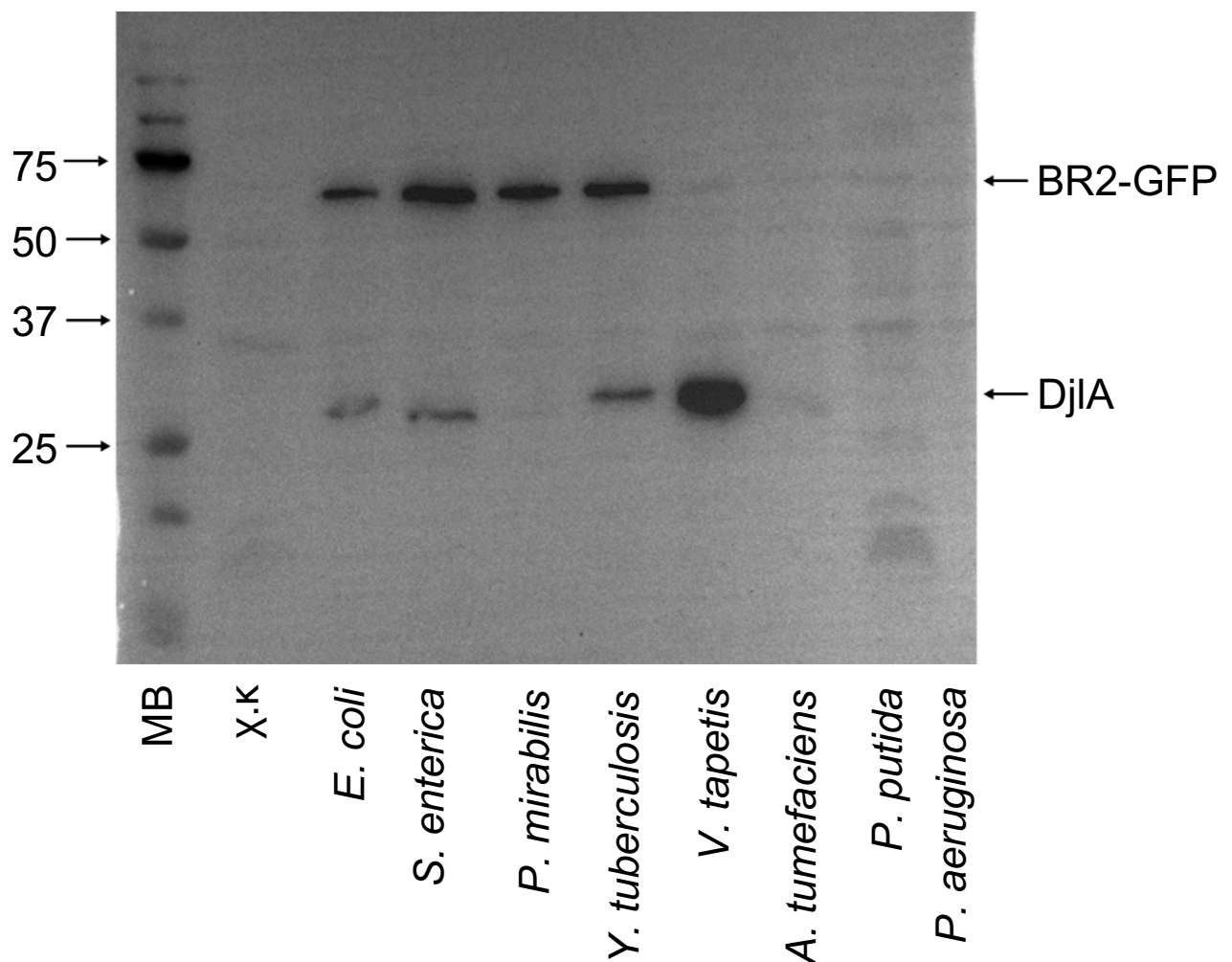
Σχήμα 35: Η συμπαραγωγή συγκεκριμένων DjlA πρωτεϊνών αυξάνει την ανά κύτταρο παραγωγή, ενσωματωμένης στη μεμβράνη, BR2-GFP πρωτεΐνης.

(Επάνω) Διαγράμματα εμπρόσθιας και πλάγιας σκέδασης μετά από κυτταρομετρία ροής κυττάρων που υπερπαραγωγή την πρωτεΐνη BR2-GFP με συμπαραγωγή ή μη (χωρίς καταστολέα) διαφορετικών DjlA πρωτεϊνών με προσθήκη $100 \cdot 10^{-4}$ % w/v L(+) αραβινόζης και 200 μg/L ανυδροτετρακυκλίνης για 16 h στους 25 °C. (Κάτω) Σύγκριση των επιπέδων φθορισμού μεμονωμένων *E. coli* κυττάρων τα οποία υπερπαραγωγή τη χημιακή πρωτεΐνη BR2-GFP παρουσία ή μη καταστολέα. Η οριοθέτηση κυττάρων που μετρηθήκαν παρουσιάζεται με μια γκρι γραμμή (επάνω). Προσαρμοσμένο σχήμα από Michou et al.¹⁵⁰



Σχήμα 36: Η χρήση των πρωτεϊνών Dj1A που προέρχονται από διαφορετικά βακτήρια αυξάνουν σημαντικά την ογκομετρική παραγωγικότητα διαμεμβρανικής πρωτεΐνης.

Διάγραμμα συγκριτικής μέτρησης σχετικού GFP φθορισμού κυττάρων που προέρχονται από ίσο όγκο καλλιέργειας και παράγουν τη χιμαιρική πρωτεΐνη BR2-GFP μετά από προσθήκη $100 \cdot 10^{-4} \% w/v$ L(+) αραβινόζης και 200 $\mu g/L$ ανυδροτετρακυκλίνης για 16 h στους 25 °C. ανυδροτετρακυκλίνης (aTc), για 16 ώρες στους 25 °C. Ο φθορισμός των κυττάρων που παράγουν τη πρωτεΐνη BR2-GFP χωρίς τη χρήση καταστολέα ορίστηκε ως μονάδα. Οι μετρήσεις έχουν πραγματοποιηθεί σε τριπλές καλλιέργειες, τουλάχιστον 3 ανεξάρτητες φορές, και τα σφάλματα αντιπροσωπεύουν μία τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή (\pm s.e.m.). Η στατιστική σημαντικότητα αναφέρεται στις διαφορές συγκριτικά με τα δείγματα όπου δεν έχει χρησιμοποιηθεί καταστολέας, και οποιαδήποτε άλλη σύγκριση σημαίνεται με μία μπάρα μεταξύ των δειγμάτων που συγκρίνονται. Προσαρμοσμένο σχήμα από Michou et al.¹⁵⁰

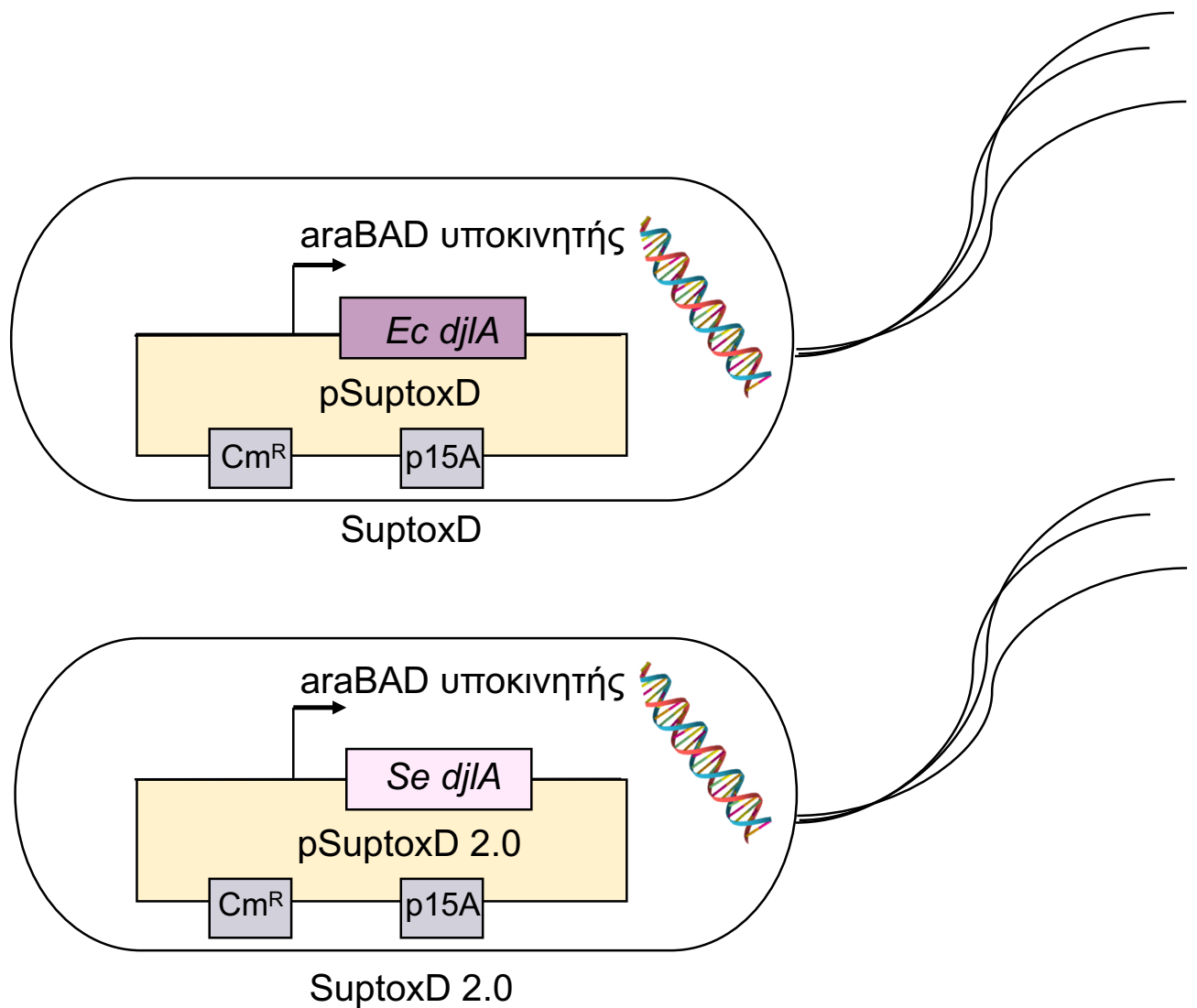


Σχήμα 37: Η συμπαραγωγή των περισσότερων DjlA πρωτεϊνών αυξάνουν σημαντικά τα επίπεδα παραγόμενης και ενσωματωμένης στη μεμβράνη πρωτεΐνης BR2-GFP.

Ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες, και μετά από ανοσοαποτύπωση κατά Western απομονωμένων ολικών μεμβρανών από κύτταρα που δεν περιέχουν καταστολέα κι από κύτταρα που συνεκφράζουν DjlA από διαφορετικούς οργανισμούς, προέρχονται από ίσο όγκο καλλιέργειας και παράγουν τη χιμαιρική πρωτεΐνη BR2-GFP χρησιμοποιώντας το αντίσωμα αντι-HIS που στοχεύει στο C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης, σε δείγματα όπου έχει προηγηθεί βρασμός. Προσαρμοσμένο σχήμα από Michou et al.¹⁵⁰

5.4 Ανάπτυξη του στελέχους 2^{ns} γενιάς SuptoxD2.0

Ανάμεσα στις φυσικά απαντώμενες DjlA πρωτεΐνες που βρήκαμε πως μπορούν και δρουν ως καταστολείς, της επαγόμενης από την υπερέκφραση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, κυτταροτοξικότητας, διαπιστώσαμε πως η DjlA που προερχόταν από τον οργανισμό *S. enterica* ήταν η πλέον αποτελεσματική. Συγκεκριμένα, η αποτελεσματικότητά της ξεπερνά αυτή της ενδογενούς πρωτεΐνης του στελέχους SuptoxD, και από πλευράς καταπολέμησης της κυτταροτοξικότητας (16% υψηλότερη τελική κυτταρική πυκνότητα), αλλά και από πλευράς παραγωγικότητας (16% υψηλότερη ογκομετρική συσσώρευση των πρωτεϊνών) (Σχήματα 34-37). Βασιζόμενοι σε αυτή τη διαπίστωση, σχεδιάσαμε ένα 2^{ns} γενιάς SuptoxD στέλεχος, ονόματι SuptoxD2.0. Το στέλεχος αυτό υπερεκφράζει το γονίδιο *S. enterica djlA* υπό τον έλεγχο του *araBAD* υποκινητή (Σχήμα 38)¹⁵⁰.



Σχήμα 38: Τα στελέχη SuptoxD και SuptoxD2.0.

Οι ευεργετικές ιδιότητες των στελεχών 1^{ης} και 2^{ης} γενιάς οφείλονται στα γονίδια *E. coli djlA* (*Ec djlA*) και *S. enterica djlA* (*Se djlA*) που κωδικοποιούνται από τα πλασμίδια *pSuptoxD* και *pSuptoxD2.0* αντίστοιχα, υπό τον έλεγχο του *araBAD* υποκινητή.

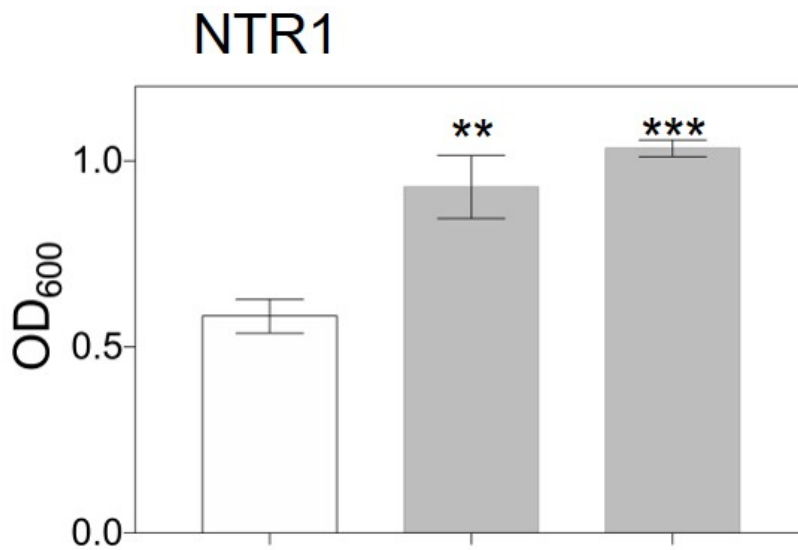
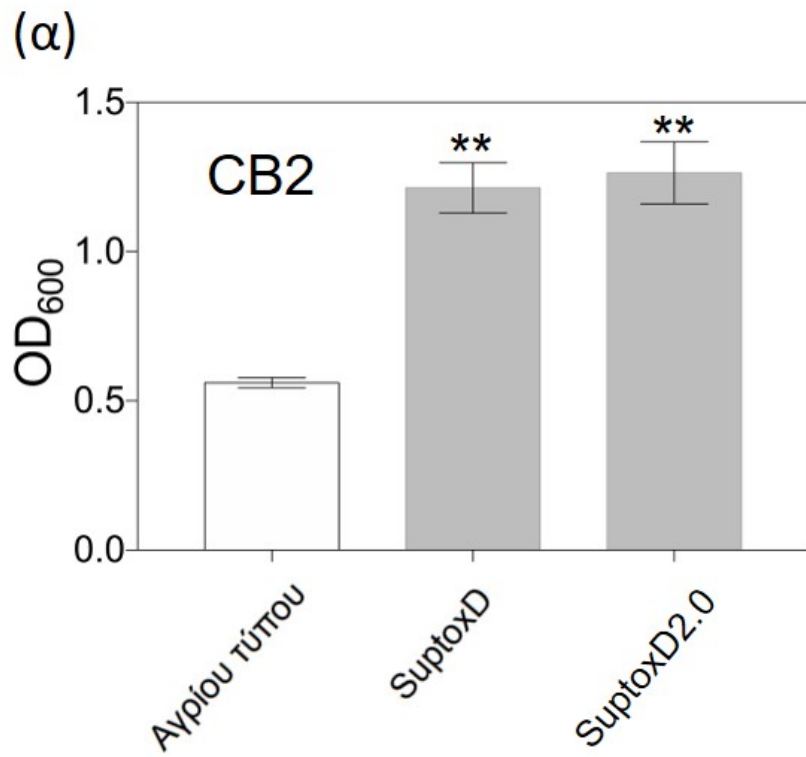
5.5 Οι ευεργετικές ιδιότητες του στελέχους 2^{ης} γενιάς SuptoxD2.0 μπορούν να εφαρμοστούν σε διαμεμβρανικές πρωτεΐνες διαφορετικών χαρακτηριστικών

Θέλοντας να εξετάσουμε αν οι βελτιωμένες ιδιότητες του SuptoxD2.0 έναντι του SuptoxD μπορούσαν να εφαρμοστούν και σε άλλες μεμβρανικές πρωτεΐνες, διαλέξαμε δύο μεμβρανικές πρωτεΐνες οι οποίες ανήκουν κι αυτές στους GPCRs. Οι πρωτεΐνες αυτές ήταν ευκαρυωτικής προελεύσεως και ήταν η NTR1(D03) και ο περιφερικός υποδοχέας κανναβινοειδών CB2 (πίνακας 1, Κεφάλαιο 8). Και οι δύο μεμβρανικές πρωτεΐνες ήταν, και σε αυτή τη περίπτωση, συζευγμένες με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) στο καρβοξυτελικό τους άκρο (C-terminus) ούτως ώστε να υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του φθορισμού των κυττάρων και της παραγόμενης πρωτεΐνης που έχει ενσωματωθεί στη μεμβράνη, καθώς επίσης έφεραν κι έναν επίτοπο ιστοιδίνης (HIS) στο καρβοξυτελικό τους άκρο (C-terminus), καθώς κι έναν επίτοπο FLAG στο αμινοτελικό τους άκρο (N-terminus) για τον ανοσοεντοπισμό τους.

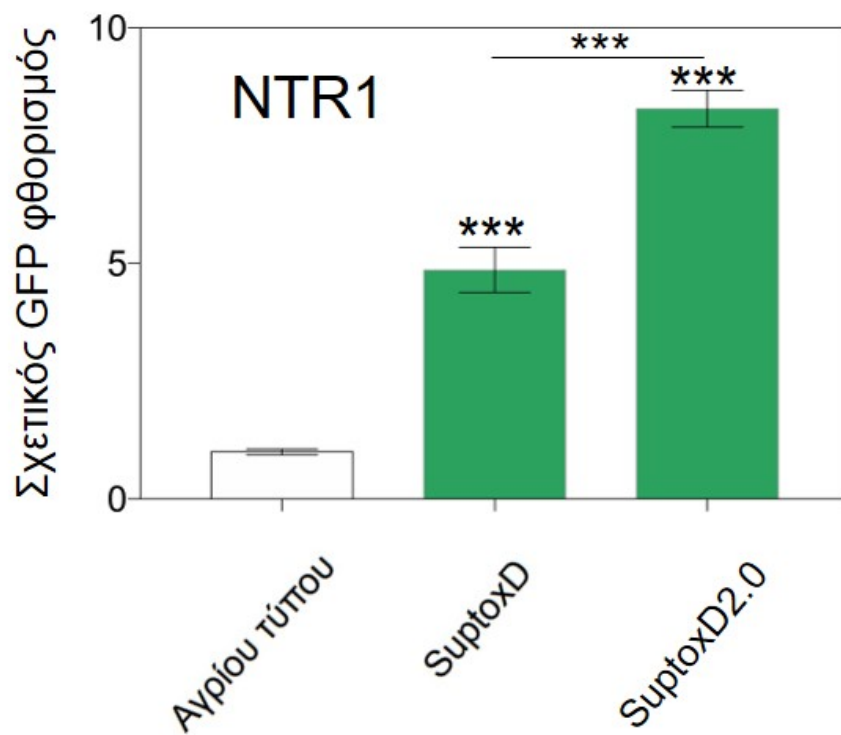
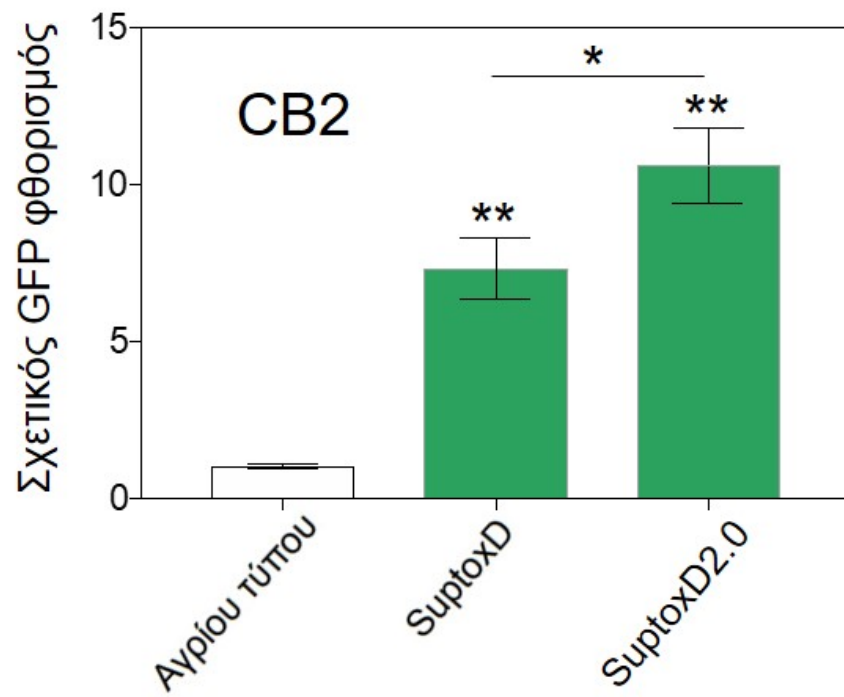
Μετά το πέρας της διαδικασίας της υπερέκφρασης και των δυο διαμεμβρανικών πρωτεϊνών σε κύτταρα αγρίου τύπου, καθώς και στα στελέχη SuptoxD και SuptoxD2.0, υπό τις κατάλληλες συνθήκες, καταλήξαμε στις εξής παρατηρήσεις: (i) Η χρήση του στελέχους SuptoxD2.0 αποφέρει μία ακόμα πιο μεγάλη αύξηση στην κυτταρική πυκνότητα, καθιστώντας πλέον ξεκάθαρη την ευεργετική του δράση στην αντιμετώπιση της κυτταροτοξικότητας έναντι του SuptoxD και φυσικά συγκρινόμενο με τα κύτταρα αγρίου τύπου όπου δε γίνεται

υπερπαραγωγή καμίας Dj1A πρωτεΐνης (Σχήμα 39α), (ii) Η ογκομετρική αύξηση των παραγόμενων διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, μετρώντας το σχετικό φθορισμό των καλλιέργειών και συσχετίζοντάς τον με την παραγόμενη, ενσωματωμένη στη μεμβράνη, πρωτεΐνη σε δείγματα από ίσο όγκο καλλιέργειας, ήταν θεαματική έναντι του στελέχους SuptoxD. Συγκεκριμένα, κατά τη χρήση του στελέχους SuptoxD2.0 παρατηρήθηκε 45% αύξηση της ογκομετρικής συσσώρευσης της πρωτεΐνης CB2-GFP και 70% αύξηση της ογκομετρικής συσσώρευσης της πρωτεΐνης NTR1(D03)-EGFP συγκριτικά με την αντίστοιχη ογκομετρική συσσώρευση των πρωτεϊνών αυτών όταν παράγονται στο στέλεχος SuptoxD (Σχήμα 39β) και (iii) κατά την απομόνωση ολικών μεμβρανών από καλλιέργεια- μάρτυρα με κύτταρα αγρίου τύπου (όπου δεν υπάρχει παραγωγή πρωτεΐνης Dj1A) και από κύτταρα SuptoxD και SuptoxD2.0 που είχαν χρησιμοποιηθεί για την υπερέκφραση της μεμβρανοπρωτεΐνης NTR1(D03)-EGFP, καθώς και της μεμβρανοπρωτεΐνης CB2-GFP, επιβεβαιώθηκε πως ο αυξημένος κυτταρικός φθορισμός που παρατηρήθηκε οφείλεται σε αυξημένη παραγωγή πλήρους μήκους, σωστά ενσωματωμένης και αναδιπλωμένης διαμεμβρανικής πρωτεΐνης, όπως γίνεται εμφανές και από το σχήμα 39γ. Η διαπίστωση αυτή προέκυψε μετά την ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες, ανάλυση ενδοπηκτικού φθορισμού (in gel fluorescence), καθώς και ανάλυση μετά από ανοσοαποτύπωση κατά Western.

Έτσι, επιβεβαιώθηκε πως το στέλεχος SuptoxD2.0, όχι μόνο προάγει την επιτυχή υπερπαραγωγή πρωτεΐνης σωστά ενσωματωμένης στη μεμβράνη, αλλά μπορεί και παράγει αυξημένα ποσά σωστά αναδιπλωμένης διαμεμβρανικής πρωτεΐνης, φαινόμενο το οποίο εφαρμόζεται σε διαφορετικών χαρακτηριστικών μεμβρανικές πρωτεΐνες.



(β)



(γ)

MB
(kDa)

75 →



Με βρασμό
Ανοσοαποτύπωση με α-GFP

75 →

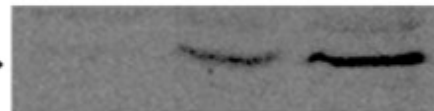


Με βρασμό
Ανοσοαποτύπωση
με α-FLAG

CB2

MB
(kDa)

50 →



Χωρίς βρασμό
Ενδοπηκτικός
φθορισμός

75 →



Με βρασμό
Ανοσοαποτύπωση με α-His

75 →



Με βρασμό
Ανοσοαποτύπωση
με α-FLAG

NTR1
(D03)

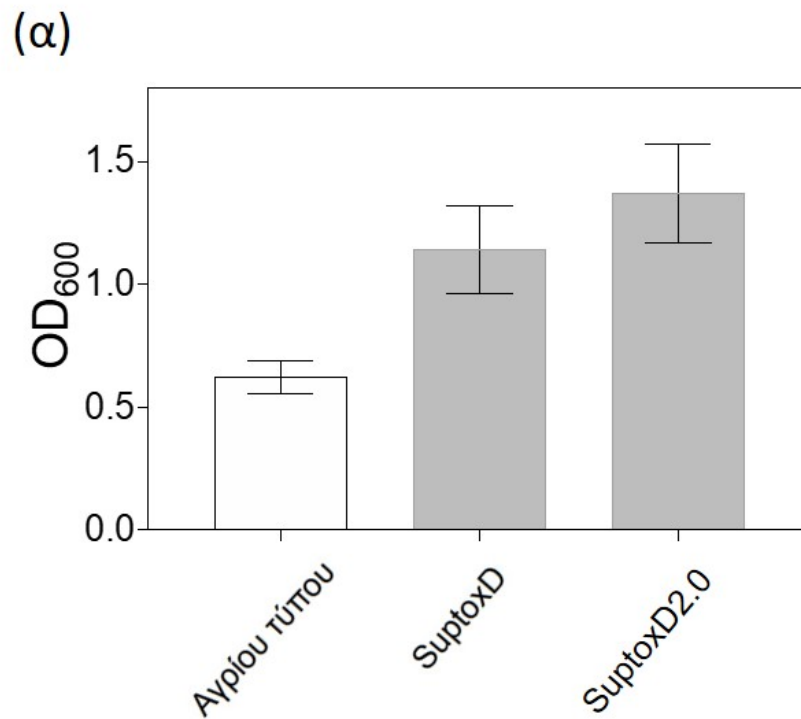
Σχήμα 39: Το στέλεχος SuptoxD2.0 επιτυγχάνει ακόμα πιο αυξημένα επίπεδα παραγωγής διαμεμβρανικών πρωτεϊνών.

(α) Μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 600nm, από ίσο όγκο καλλιέργειας, όπου παράγεται η χιμαιρική πρωτεΐνη CB2-GFP (επάνω) και η NTR1(D03)-EGFP (κάτω) μετά από προσθήκη $100 \cdot 10^{-4} \% w/v$ L(+) αραβινόζης, και 0.2 $\mu g/mL$ aTc για 16 ώρες στους 25 °C σε κύτταρα αγρίου τύπου, SuptoxD και SuptoxD2.0. (β) Μέτρηση σχετικού GFP φθορισμού κυττάρων αγρίου τύπου, SuptoxD και SuptoxD2.0 που προέρχονται από ίσο όγκο καλλιέργειας και παράγουν τη χιμαιρική πρωτεΐνη CB2-GFP (επάνω) και τη NTR1(D03)-EGFP (κάτω) Ο φθορισμός των κυττάρων αγρίου τύπου ορίστηκε ως μονάδα. (γ) Ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες, ανάλυση ενδοπηκτικού φθορισμού, καθώς και ανάλυση μετά από ανοσοαποτύπωση κατά Western απομονωμένων ολικών μεμβρανών από κύτταρα αγρίου τύπου SuptoxD και SuptoxD2.0 που προέρχονται από ίσο όγκο καλλιέργειας και παράγουν τις χιμαιρικές πρωτεΐνες CB2-GFP (αριστερά) και NTR1(D03)-EGFP (δεξιά), όπως περιεγράφηκε στο (β), χρησιμοποιώντας το αντίσωμα αντι-HIS ή το αντι-GFP που στοχεύει στο C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης ή το αντίσωμα αντι-FLAG που στοχεύει στο N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης, σε δείγματα όπου έχει προηγηθεί βρασμός (με βρασμό) και σε άλλα που δεν έχει προηγηθεί βρασμός (χωρίς βρασμό). Οι μετρήσεις στα (α) και (β) έχουν πραγματοποιηθεί σε τριπλές καλλιέργειες, τουλάχιστον 3 ανεξάρτητες φορές, και τα σφάλματα αντιπροσωπεύουν μία τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή ($\pm s.e.m.$). Η στατιστική σημαντικότητα αναφέρεται στις διαφορές συγκριτικά με τα δείγματα από τα κύτταρα αγρίου τύπου και οποιαδήποτε άλλη σύγκριση σημαίνεται με μία μπάρα μεταξύ των δειγμάτων που συγκρίνονται. Προσαρμοσμένο σχήμα από Michou et al.¹⁵⁰

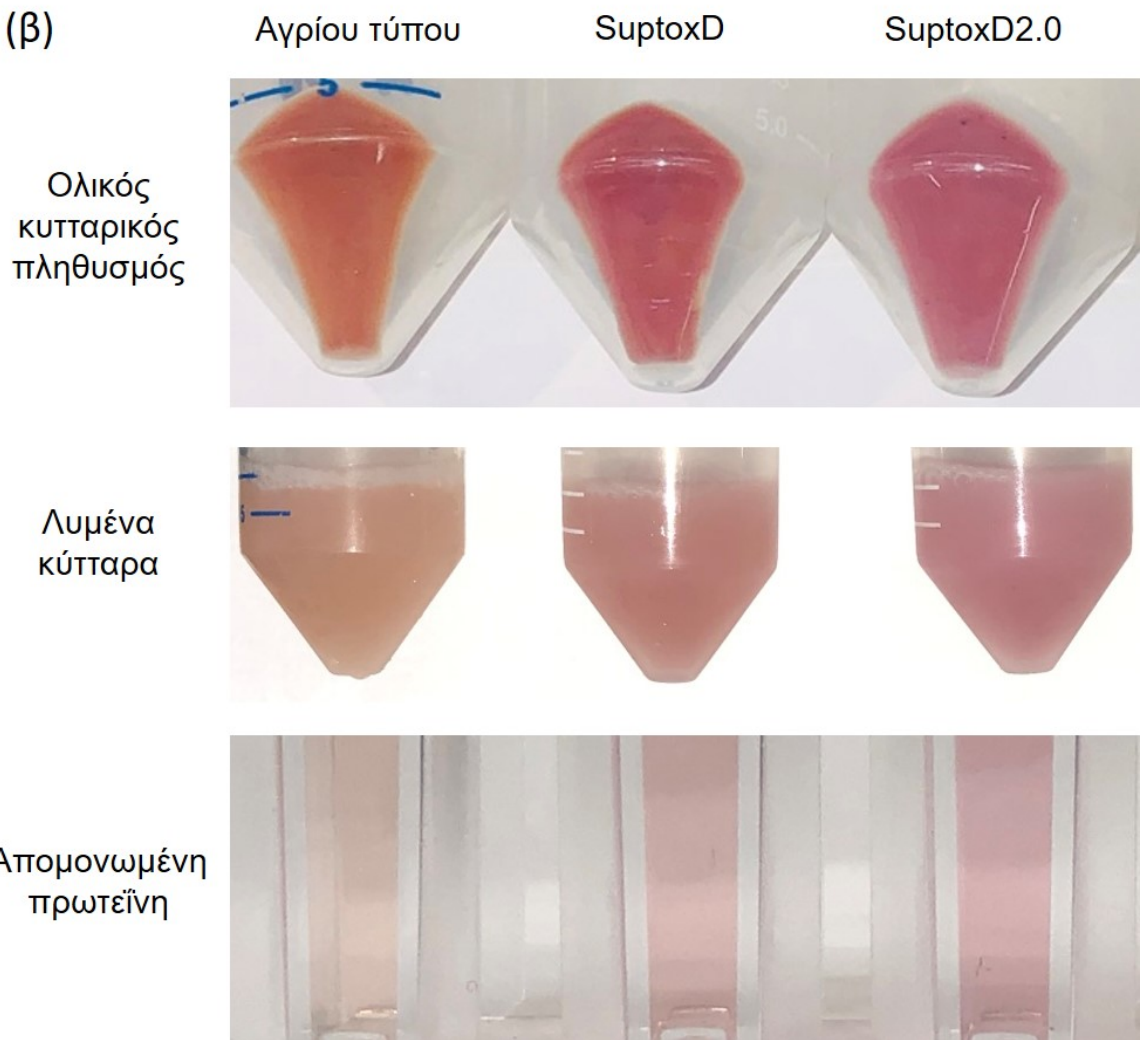
5.6 Το στέλεχος *E. coli* SuptoxD2.0 παράγει αυξημένες ποσότητες υψηλής ποιότητας και ενεργούς διαμεμβρανικής πρωτεΐνης συγκριτικά με το αρχικό στέλεχος SuptoxD

Προκειμένου να διερευνήσουμε αν η αυξημένη ποσότητα σωστά ενσωματωμένης στη μεμβράνη και αναδιπλωμένης, πλήρους μήκους πρωτεΐνης που παράγεται με χρήση του στελέχους SuptoxD2.0 ήταν και βιολογικώς λειτουργική, χρησιμοποιήσαμε την πρωτεΐνη HtdR. Προς την κατεύθυνση αυτή, χρησιμοποιήσαμε *E. coli* κύτταρα αγρίου τύπου, SuptoxD καθώς και SuptoxD2.0, και υπό τις κατάλληλες συνθήκες, υπερπαραίσαμε την πρωτεΐνη HtdR η οποία κι έφερε κι έναν επίτοπο ιστιδίνης (HIS) στο καρβοξυτελικό της άκρο (C-terminus) (Σχήμα 40). Μετά την παραγωγή της HtdR στο στέλεχος SuptoxD2.0, διαπιστώθηκε πως το SuptoxD2.0 είχε καταφέρει να παράξει αυξημένα επίπεδα ολικής βακτηριακής βιομάζας, κρίνοντας από την αύξηση της οπτικής πυκνότητας των καλλιεργειών, συγκρινόμενο με το στέλεχος SuptoxD, καθώς και με τα κύτταρα αγρίου τύπου (Σχήμα 40). Επιπροσθέτως, τόσο η ολική όσο και η απομονωμένη, με χρήση επιφανειοενεργού DDM, ενεργή πρωτεΐνη που παράγεται στο στέλεχος SuptoxD2.0 ξεπερνά σε σημαντικό βαθμό, την ήδη αυξημένη παραγωγή ενεργής πρωτεΐνης από το στέλεχος SuptoxD. Οι παρατηρήσεις αυτές επιβεβαιώνονται και από το χρώμα, καθώς η ένταση του χρώματος του κατακρημνισμένου κυτταρικού πληθυσμού του στελέχους SuptoxD2.0 είναι πολύ πιο έντονη, συγκριτικά με τα κύτταρα του στελέχους SuptoxD καθώς και με τα κύτταρα αγρίου τύπου που υπερπαραίγουν την HtdR (Σχήμα 40β πάνω/μέση). Αυτό γίνεται ακόμα πιο προφανές κατά την παρατήρηση του

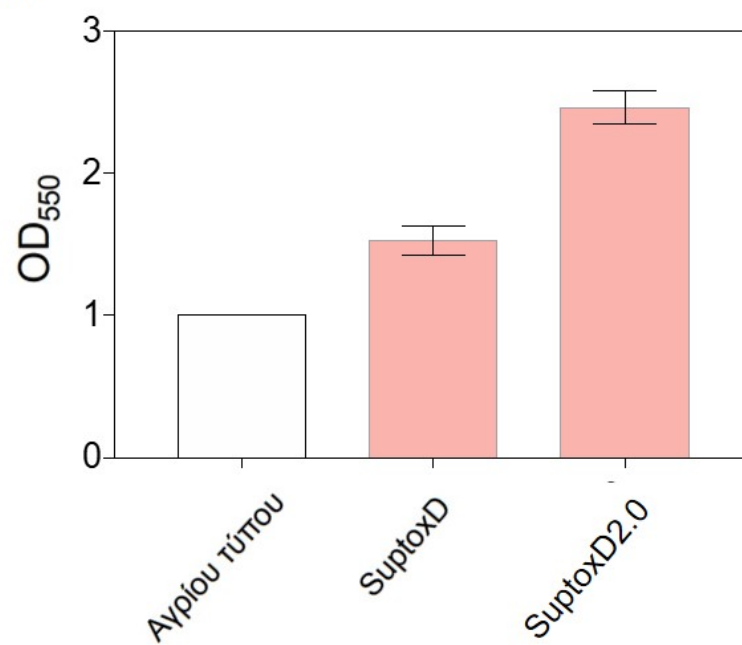
χρώματος της απομονωμένης, με χρήση επιφανειοενεργού DDM, πρωτεΐνης (Σχήμα 40β κάτω), γεγονός το οποίο επιβεβαιώνεται κι από τις μετρήσεις σχετικής απορρόφησης στα 550 nm (Σχήμα 40γ).



(β)



(γ)



Σχήμα 40: Το στέλεχος SuptoxD2.0 επιτυγχάνει τη παραγωγή ακόμα πιο αυξημένης ποσότητας λειτουργικής πρωτεΐνης συγκριτικά με το στέλεχος SuptoxD

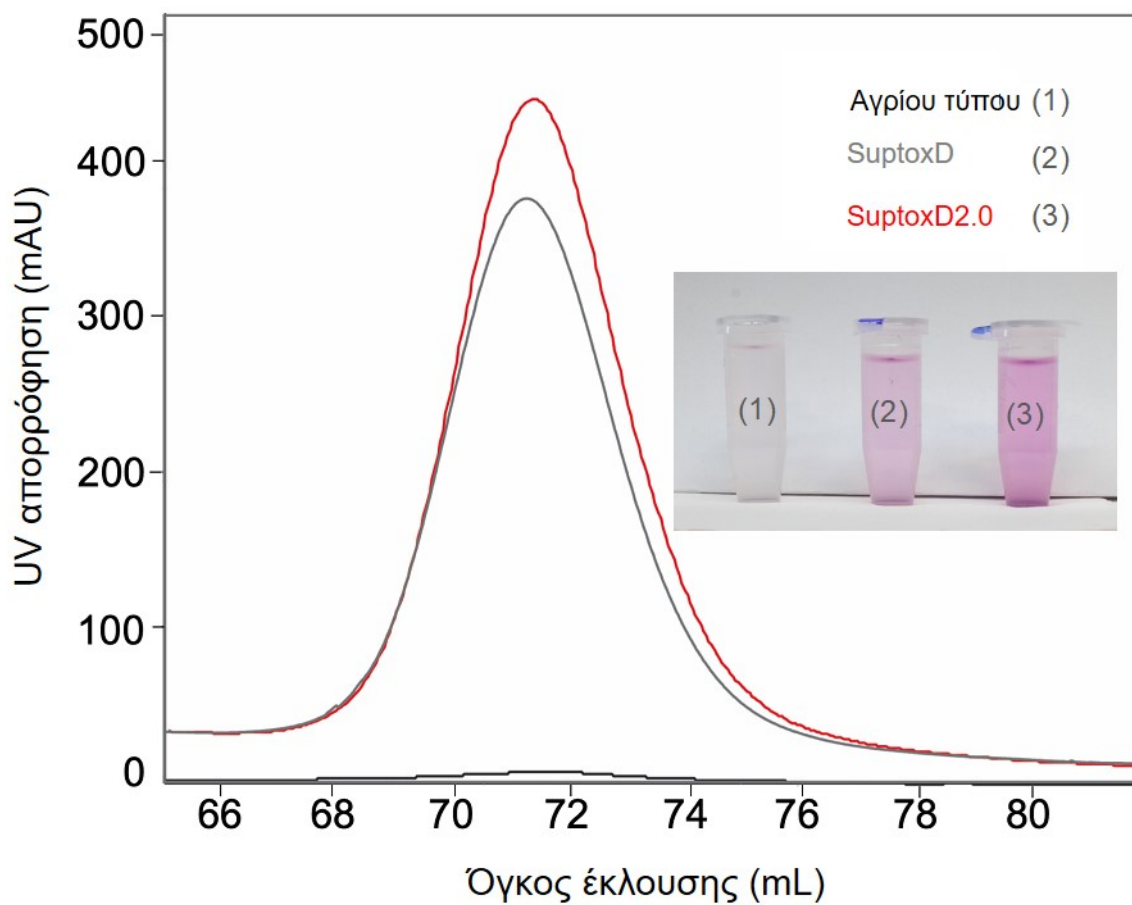
(α) Μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 600nm, από ίσο όγκο καλλιέργειας, όπου παράγεται η πρωτεΐνη HtdR μετά από προσθήκη $100 \cdot 10^{-4}$ % w/v L(+) αραβινόζης, 0.2 μg/mL aTc και 10 μM all-trans-retinal για 16 ώρες στους 25 °C σε κατάσταση σκότους, σε κύτταρα αγρίου τύπου, SuptoxD και SuptoxD2.0. (β) Σχετική απορρόφηση στα 550nm των δειγμάτων του (α). (γ) Φωτογραφίες του κατακρημνισμένου ολικού κυτταρικού πληθυσμού (επάνω), των λυμένων κυττάρων του (α), καθώς και του κλάσματος της απομονωμένης, με χρήση του επιφανειοενεργού DDM, πρωτεΐνης, η οποία προέρχεται από ίσο όγκο των καλλιεργειών των κυττάρων που φαίνονται στα (α) και (β). Οι μετρήσεις στα (α) και (β) έχουν προέλθει από τον μέσο όρο 3 ανεξάρτητων πειραμάτων, και τα σφάλματα αντιπροσωπεύουν μία τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή (\pm s.e.m.). Η στατιστική σημαντικότητα αναφέρεται στις διαφορές συγκριτικά με τα δείγματα από τα κύτταρα αγρίου τύπου και οποιαδήποτε άλλη σύγκριση σημαίνεται με μία μπάρα μεταξύ των δειγμάτων που συγκρίνονται. Προσαρμοσμένο σχήμα από Michou et al.¹⁵⁰

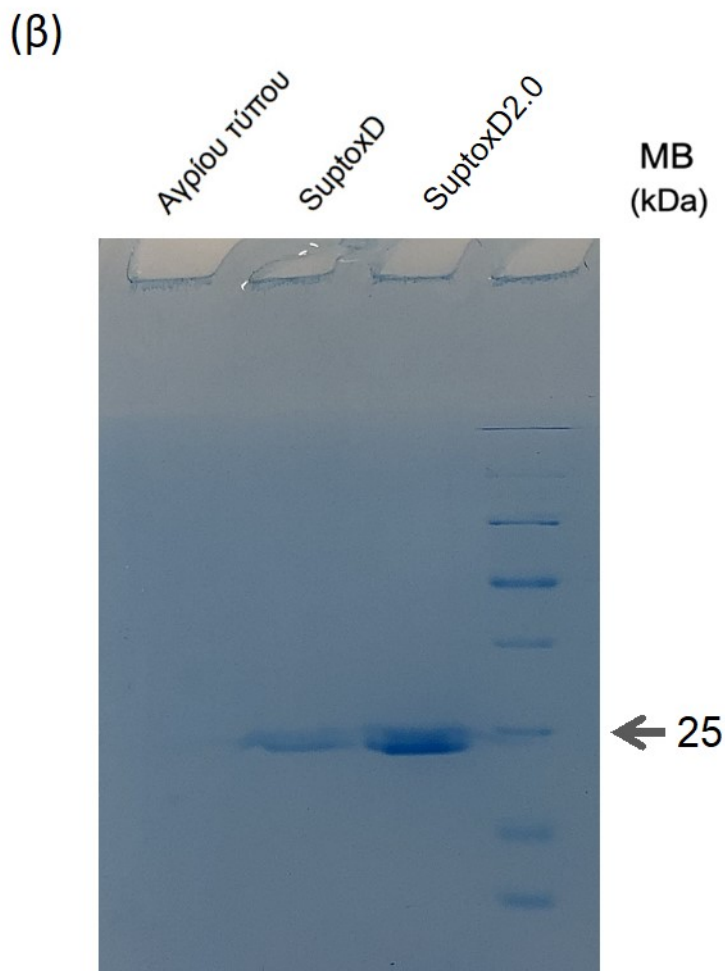
Μετά τη διαπίστωση πως το *E. coli* στέλεχος 2^{ns} γενιάς SuptoxD2.0 είναι ικανό να παράξει ακόμα πιο αυξημένα επίπεδα λειτουργικής πρωτεΐνης HtdR συγκριτικά με το στέλεχος SuptoxD, το επόμενο βήμα ήταν ο προσδιορισμός της απόδοσης που μπορεί το SuptoxD2.0 να αποφέρει σε απομονωμένη πρωτεΐνη. Για το σκοπό αυτό, παράξαμε την πρωτεΐνη HtdR σε όγκο καλλιέργειας 1 λίτρου σε κύτταρα αγρίου τύπου, SuptoxD, και SuptoxD2.0. Μετά την εξαγωγή της πρωτεΐνης από τις ολικές μεμβράνες των κυττάρων με χρήση του επιφανειοενεργού DDM, προβήκαμε στην απομόνωση της πρωτεΐνης. Το πρώτο στάδιο της απομόνωσης πραγματοποιήθηκε με χρήση χρωματογραφίας IMAC. Στη συνέχεια, η απομονωμένη πρωτεΐνη συμπυκνώθηκε και ακολούθησε χρωματογραφία μοριακής διήθησης (Size Exclusion Chromatography, SEC) σε όλα τα δείγματα μας, υπό ακριβώς τις ίδιες συνθήκες.

Η συγκέντρωση της απομονωμένης πρωτεΐνης HtdR, όταν αυτή παράγεται στο στέλεχος SuptoxD2.0, υπολογίστηκε να είναι περίπου 4.4 mg/L. Αυτή η συγκέντρωση ήταν περίπου 16% υψηλότερη από τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης όταν αυτή παράγεται στο στέλεχος SuptoxD (3.8 mg/L) καθώς και πολύ πιο υψηλή από την παραγόμενη, σε κύτταρα αγρίου τύπου κύτταρα, πρωτεΐνη (0.1 mg/L). Επιπλέον, η πρωτεΐνη που παρήχθη από το στέλεχος SuptoxD2.0 εκλούστηκε ως μονή κορυφή κατά τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης, γεγονός που σημαίνει πως στο διάλυμα DDM, η καθαρή πρωτεΐνη HtdR βρίσκεται σε αναδιπλωμένη και μη συσσωματωμένη μορφή (Σχήμα 41α). όπως επίσης και σε ενεργή μορφή (φωτογραφία εσωτερικά του σχήματος 41α).

Η επαρκής καθαρότητα των κορυφών που δημιουργήθηκαν κατά τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης προσδιορίστηκαν με ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE) και χρώση με Coomassie blue (Σχήμα 41β). Κατά την ανάλυση αυτή, όπως φαίνεται και στο σχήμα 44β, σχηματίζεται μία μονή ζώνη, στην περίπτωση της καθαρής πρωτεΐνης HtdR από το στέλεχος SuptoxD2.0, η οποία αντιστοιχεί στο αναμενόμενο μοριακό της μέγεθος (περίπου 25 kDa), η οποία είναι σαφώς μεγαλύτερη από τη μονή επίσης ζώνη που σχηματίζει η καθαρή πρωτεΐνη HtdR που προέρχεται από το στέλεχος SuptoxD.

(α)





Σχήμα 41: Το στελέχος SuptoxD2.0 παράγει υψηλά ποσά ενεργής και καθαρής πρωτεΐνης.

(α) Διάγραμμα SEC καθαρής πρωτεΐνης HtdR από κύτταρα αγρίου τύπου (μαύρη γραμμή), κύτταρα του στελέχους SuptoxD (γκρι γραμμή) και κύτταρα του στελέχους SuptoxD2.0 (κόκκινη γραμμή). Φωτογραφίες δειγμάτων καθαρής πρωτεΐνης HtdR από κύτταρα αγρίου τύπου, SuptoxD και SuptoxD2.0. Το μωβ χρώμα υποδηλώνει ύπαρξη ενεργής πρωτεΐνης (β) Ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες και χρώση με Coomassie blue, των δειγμάτων από τις κορυφές που διαμορφώθηκαν κατά το SEC (α). MB: Μοριακό Βάρος. Τα νούμερα υποδεικνύουν το μοριακό μέγεθος των πρωτεϊνών σε kDa. Προσαρμοσμένο σχήμα από Michou et al.¹⁵⁰

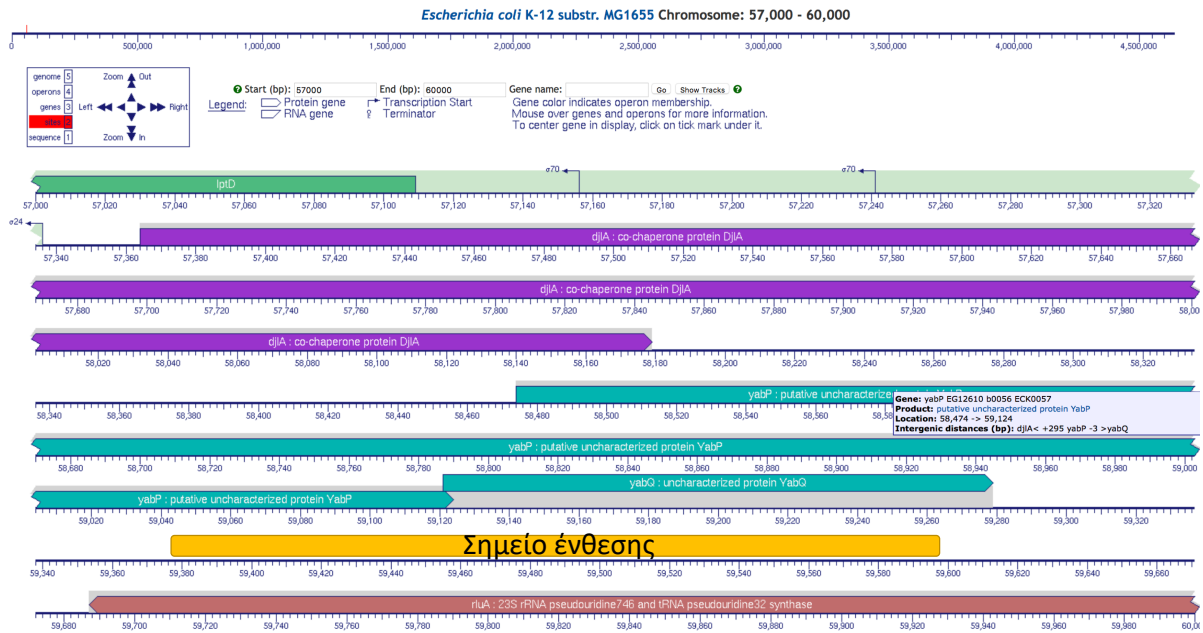
Κεφάλαιο 6 – Τρέχουσες μελέτες- Μελλοντικές Προτάσεις

6.1 Ανάπτυξη στελεχών SuptoxD* και SuptoxD2.0*

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα στελέχη μας, για τις ευεργετικές τους ιδιότητες, στηρίζονται στη χρήση πλασμιδιακών φορέων. Τα πλασμίδια, αν και εξαιρετικά χρήσιμα, χαρακτηρίζονται από ορισμένα μειονεκτήματα, όπως είναι η χρήση αντιβιοτικών, και το ενεργειακό φορτίο τους που επιβαρύνει το κύτταρο-φορέα. Έτσι, σε συνθήκες αυξημένων ενεργειακών απαιτήσεων ή στρεσογόνων συνθηκών που μπορούν να επηρεάσουν την επιβίωση του κυττάρου, το τελευταίο μπορεί να αποβάλλει το πλασμίδιο/α. Όσα περισσότερα πλασμίδια φέρει ένα κύτταρο, τόσο και πιο «ασταθές» μπορεί να αποβεί. Επιπλέον, ο αριθμός των αντιγράφων ενός πλασμιδίου που φέρει ένα κύτταρο, είναι πιθανό να επηρεάζεται και από το αναπτυξιακό στάδιο του κυττάρου¹⁵¹, κι ακόμα κι αν δύο κύτταρα βρίσκονται σε σταθερές συνθήκες αύξησης, οι διακυμάνσεις που εντοπίζονται στον αριθμό των αντιγράφων ενός πλασμιδίου, μπορεί να είναι κρίσιμες¹⁵². Γι αυτόν ακριβώς τον λόγο, πρόκειται να κατασκευαστεί ένα νέο βελτιωμένο *E. coli* στέλεχος το οποίο θα ονομαστεί SuptoxD*, και θα διακρίνεται από το εξής σημαντικό χαρακτηριστικό: θα φέρει το *E. coli* γονίδιο *djlA* ενσωματωμένο, έπειτα από ομόλογο ανασυνδυασμό, μέσα στο χρωμόσωμά του *E. coli*, υπό την καθοδήγηση του *araBAD* υποκινητή και του επαγωγέα του, της L (+) αραβινόζης. Έτσι, το μόνο πλασμίδιο που θα χρησιμοποιείται σε αυτό το στέλεχος θα είναι μόνο αυτό που θα φέρει κλωνοποιημένο το γονίδιο που κωδικοποιεί για την εκάστοτε διαμεμβρανική πρωτεΐνη προς παραγωγή. Στοχεύουμε σε ένα πιο σταθερό, πλήρως ελεγχόμενο

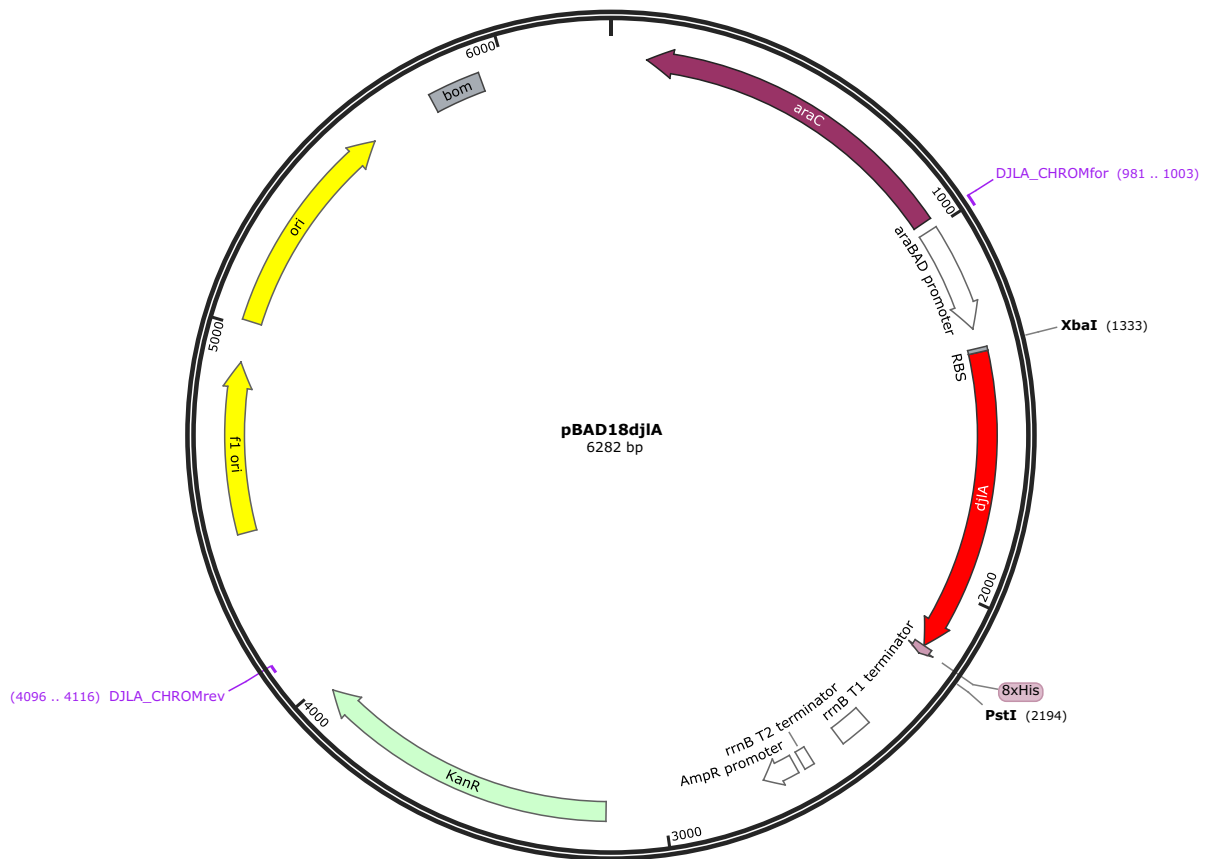
σύστημα, το οποίο να χρησιμοποιηθεί ευρέως για την παραγωγή διαμεμβρανικών πρωτεϊνών σε μεγαλύτερη απόδοση, εξασφαλίζοντας την ομοιογένεια των καλλιιεργειών σε πιθανώς ακόμα πιο υψηλή κυτταρική πυκνότητα.

Προκειμένου να το επιτύχουμε, πραγματοποιήσαμε κλωνοποίηση του *E. coli* γονιδίου *djlA* στον πλασμιδιακό φορέα pBAD18 (Kan^R). Στο συγκεκριμένο πλασμιδιακό φορέα, το γονίδιο *djlA* βρίσκεται υπό τον έλεγχο του araBAD υποκινητή και του επαγωγέα του, της L (+) αραβινόζης. Εν συνεχεία, επιλέξαμε σε ποιο σημείο του χρωμοσώματος του *E. coli* θα πραγματοποιήσουμε την ένθεση του γονιδίου χρησιμοποιώντας ομόλογο ανασυνδυασμό: επιλέξαμε μία περιοχή η οποία στερείτο γονιδίων, ενώ ταυτοχρόνως βρισκόταν σε κοντινή απόσταση από το σημείο όπου εδράζεται το ενδογενές γονίδιο *djlA* (Σχήμα 42). Σχεδιάστηκαν εκκινητές οι οποίοι έφεραν ομολογία με την περιοχή του χρωμοσώματος όπου θα γίνει η ένθεση (ομόλογος ανασυνδυασμός), καθώς και ομολογία με τον ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό φορέα pBAD18DjlA, ούτως ώστε να ενισχυθεί ο araBAD υποκινητής, το γονίδιο *djlA*, καθώς και το γονίδιο το οποίο προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό καναμυκίνη (Σχήμα 43). Το προϊόν υπεβλήθη σε πέψη με κατάλληλα ένζυμα περιορισμού προκειμένου να εξασφαλισθεί πως δεν εμπεριέχεται κατάλοιπο του αρχικού πλασμιδιακού φορέα pBAD18DjlA που χρησιμοποιήθηκε, αλλά μόνο το γραμμικό προϊόν της αντίδρασης που επιθυμούσαμε να εισάγουμε εντός του χρωμοσώματος.



Σχήμα 42: Σχηματική απεικόνιση του σημείου ένθεσης του γονιδίου *djIA* εντός του χρωμοσώματος του οργανισμού *E. coli*.

Με κίτρινο χρώμα σημαίνεται η περιοχή που επιλέχθηκε προκειμένου να εισαχθεί ο araBAD υποκινητής, το γονίδιο *djIA*, καθώς και το γονίδιο Kan^R.

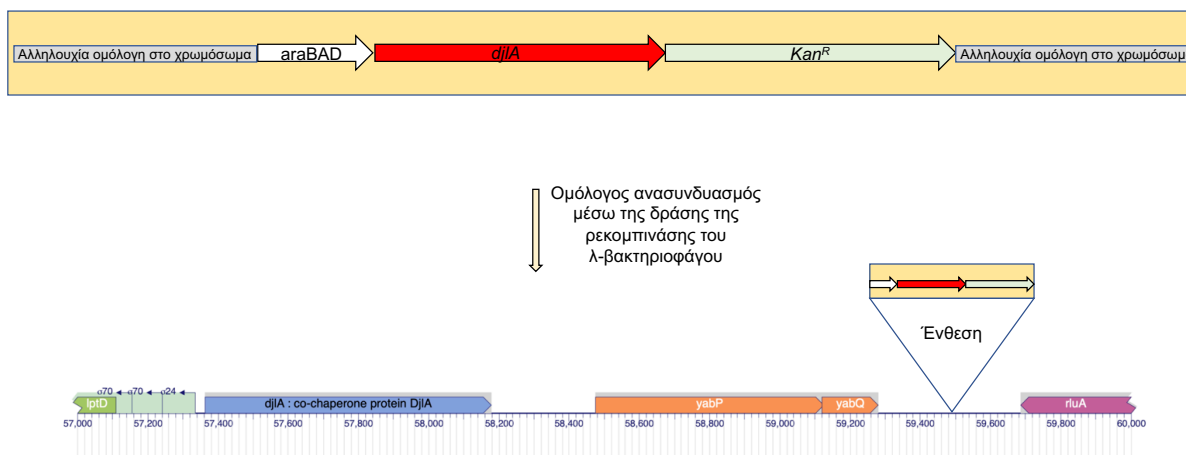


Σχήμα 43: Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pBAD18DjIA.

Η περιοχή η οποία ενισχύθηκε οριοθετείται από τους εκκινητές *DjIA_CHROMfor* και *DjIA_CHROMrev* αντιστοίχα.

Το προϊόν που παρήχθη (γραμμικό μόριο DNA το οποίο αποτελείται από τον *araBAD* υποκινητή, το γονίδιο *djIA*, καθώς και το γονίδιο το οποίο προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό καναμυκίνη και φέρει ομολογία στα άκρα με την περιοχή του χρωμοσώματος όπου και θα ενσωματωθεί), εισήχθη σε δεκτικά κύτταρα MC1061 με ηλεκτροδιάτρηση, τα οποία έφεραν ήδη τον ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό φορέα pKD46. Ο πλασμιδιακός αυτός φορέας περιείχε το γονίδιο που κωδικοποιεί για την παραγωγή του ενζύμου της ρεκομπινάσης λ-βακτηριοφάγου (Lambda Red Recombinase system)^{153, 154}, η οποία και πραγματοποιεί τον ομόλογο ανασυνδυασμό (Σχήμα 44). Για να επιτευχθεί ο ομόλογος ανασυνδυασμός και να επιβεβαιωθεί πως το γονίδιο *djIA*, μαζί με τον *araBAD* υποκινητή και το γονίδιο

που προσδίδει ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη, έχει ενσωματωθεί επιτυχώς εντός του χρωμοσώματος, ακολουθήσαμε την εξής διαδικασία: Τα μετασχηματισμένα κύτταρα, μετά την ηλεκτροδιάτρισή τους με το γραμμικό μόριο DNA, επώαστηκαν για 1 ώρα στους 30 °C προκειμένου να δράσει η ρεκομπινάση. Εν συνεχεία, μεγάλωσαν σε τρυβλία 16 ώρες στους 37 °C τα οποία, μέσα στο LB θρεπτικό μέσο, περιείχαν το αντιβιοτικό Καναμυκίνη. Οι αποικίες που σχηματίστηκαν, ελέγχθηκαν με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πως δε φέρουν κατάλοιπο του αρχικού πλασμιδιακού φορέα pBAD18DjlA, κι έτσι, η ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό καναμυκίνη υπάρχει λόγω του επιτυχούς ομόλογου ανασυνδυασμού της επιθυμητής ενθέσεως (araBAD υποκινητής, το γονίδιο *djlA*, καθώς και το γονίδιο το οποίο προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό της καναμυκίνης) εντός του χρωμοσώματος. Οι αποικίες που πληρούσαν το κριτήριο αυτό επιλέχθηκαν και μεγάλωσαν σε 2 διαφορετικές υγρές καλλιέργειες, με τη μία να περιέχει LB θρεπτικό μέσο και το αντιβιοτικό καναμυκίνη, ενώ η άλλη περιείχε LB θρεπτικό μέσο και το αντιβιοτικό αμπικιλίνη. Στόχο μας αποτελούσε η επιλογή των αποικιών που είχαν αποβάλει το πλασμίδιο που κωδικοποιούσε για την παραγωγή της ρεκομπινάσης και συνεπώς δεν παρουσίαζαν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό Αμπικιλίνη, αλλά ανθεκτικότητα μόνο στο αντιβιοτικό καναμυκίνη. Οι αποικίες με αυτές τις ιδιότητες επιλέχθηκαν ως αυτές στις οποίες ο ομόλογος ανασυνδυασμός ήταν επιτυχής.



Σχήμα 44: Σχηματική απεικόνιση του τμήματος της ένθεσης.

Η αλληλουχία που εισήχθη στο χρωμόσωμα φέρει εκατέρωθεν στα άκρα της ομόλογες αλληλουχίες με αυτές του χρωμοσώματος, προκειμένου να αναγνωριστούν από το ένζυμο της ρεκομπινάσης του λ-φάγου και να πραγματοποιηθεί ο ομόλογος ανασυνδυασμός.

Έτσι, μετά τον επιτυχή ομόλογο ανασυνδυασμό και την επιβεβαίωση αυτού, το γονίδιο *djIA* το οποίο μέχρι τώρα βρισκόταν υπό τον έλεγχο του *araBAD* υποκινητή στον πλασμιδιακό φορέα *pSuptoxD*, εντοπίζεται πλέον εντός του χρωμοσώματος του οργανισμού *E. coli*, υπό τον έλεγχο του ίδιου υποκινητή, δημιουργώντας το στέλεχος *SuptoxD**.

Η συγκεκριμένη διαδικασία θα πραγματοποιηθεί και για το γονίδιο *djIA* του οργανισμού *S. enterica*, η δράση του οποίου έχουμε διαπιστώσει πως είναι πιο ευεργετική κατά την υπερπαραγωγή διαμεμβρανικών πρωτεϊνών στον οργανισμό *E. coli*, με σκοπό τη δημιουργία του αντίστοιχου στελέχους *SuptoxD2.0**.

6.2 Ανάπτυξη περαιτέρω βελτιστοποιημένου στελέχους τρίτης γενιάς SuptoxD 3.0

Τα αποτελέσματα του Κεφαλαίου 5 μας έδειξαν ότι υπάρχει πλήθος από φυσικές παραλλαγές της DjlA που μπορούν να έχουν παρόμοιες ευεργετικές δράσεις στην παραγωγή ανασυνδυασμένων μεμβρανοπρωτεϊνών στα βακτήρια ή ακόμα και καλύτερες από τη DjlA του *E. coli*. Η παρατήρηση αυτή μας οδήγησε στη σκέψη ότι θα μπορούσαμε να κατασκευάσουμε τεχνητές παραλλαγές της DjlA που θα επεδείκνυαν δυνητικά μέγιστη αποτελεσματικότητα. Για το σκοπό αυτό, αποφασίσαμε να εφαρμόσουμε μεθόδους κατευθυνόμενης εξέλιξης πρωτεϊνών στην ενδογενή *E. coli* DjlA καθώς και στη *S. enterica* DjlA. Αυτό θα επιτευχθεί με την κατασκευή συνδυαστικής βιβλιοθήκης μεταλλαγμένων *djlA* γονιδίων, τα οποία εν συνεχεία θα μελετηθούν και θα αναλυθούν γενετικά. Με αυτόν τον τρόπο, θα βρεθεί ένα ή και περισσότερα μεταλλάγματα, ικανό να παράξει περαιτέρω αυξημένες ποσότητες ποιοτικής διαμεμβρανικής πρωτεΐνης σε σχέση με τις μητρικές αλληλουχίες.

Υπό αυτή τη συλλογιστική πορεία, έχουμε ήδη προβεί στην τυχαία μεταλλαξιγένεση μέσω επιρρεπούς-σε-σφάλμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (error-prone PCR) του *E. coli* γονιδίου *djlA* με χρήση των εκκινητών DjlAFLfor και DjlAFLrev (πίνακας 3, Κεφάλαιο 8). Όπως αναγράφεται αναλυτικά και στον πίνακα 4, προβήκαμε σε 8 διαφορετικές αντιδράσεις PCR, αποσκοπώντας καθεμία εξ αυτών να επιφέρει τελικά και διαφορετικό ποσοστό μεταλλαξιγένεσης στο γονίδιο *djlA*. Αποσκοπώντας σε ποσοστό μεταλλαξιγένεσης τουλάχιστον 0,4% σε αμινοξικό επίπεδο, επιλέξαμε τις ποσότητες που αντιστοιχούν σε ποσοστό 1% μεταλλαξιγένεσης

σε νουκλεοτιδικό επίπεδο, βάσει του πίνακα 4, καθώς διαπιστώθηκε μετά από αλληλούχηση, πως αυτές οι συνθήκες μας επέφεραν το επιθυμητό ποσοστό μεταλλαξιγένεσης. Έν συνεχεία, επρόκειτο να κλωνοποιήσουμε τα *djlA* μεταλλάγματα στον πλασμιδιακό φορέα pBAD33. Προκειμένου να κατασκευαστεί μία βιβλιοθήκη η οποία να περιλαμβάνει όσο περισσότερες διαφορετικές παραλλαγές της ενδογενούς *E. coli* Dj1A γίνεται, στόχο μας αποτελεί η βιβλιοθήκη να χαρακτηρίζεται από τουλάχιστον 10^6 διαφορετικά μέλη. Για να επιτευχθεί αυτό, θα πρέπει να βελτιστοποιηθεί κάθε βήμα ξεχωριστά: οι συγκεντρώσεις του πλασμιδιακού φορέα pBAD33 καθώς και των μεταλλαγμάτων του γονιδίου *djlA* θα πρέπει να είναι αρκετά υψηλές και τα DNA απαλλαγμένα από περιττά στοιχεία που μειώνουν την καθαρότητα και δυσχεραίνουν την αντίδραση της λιγοποίησης (πχ άλατα), θα πρέπει να βρεθεί η κατάλληλη αναλογία πλασμιδιακού φορέα: γονιδίου που να αποφέρει τον μεγαλύτερο αριθμό ανασυνδυασμένων βακτηριακών αποικιών και τέλος, τα δεκτικά βακτηριακά κύτταρα που θα χρησιμοποιηθούν για να μετασχηματιστούν με τους ανασυνδυασμένους πλασμιδιακούς φορείς θα πρέπει να χαρακτηρίζονται από υψηλή δεκτικότητα (τουλάχιστον 10^8 - 10^9 cfu/μg DNA). Αφού βελτιστοποιηθεί κάθε βήμα ξεχωριστά και επιτύχουμε τον επιθυμητό αριθμό διαφορετικό μελών στη νεοσύστατη βιβλιοθήκη μας, θα επιλέξουμε τις παραλλαγές που επιδεικνύουν αυξημένη ικανότητα στο να προάγουν τη μεμβρανοπρωτεϊνική υπερέκφραση.

Για το σκοπό αυτό, θα εφαρμόσουμε ένα γενετικό σύστημα σάρωσης υψηλής ρυθμαπόδοσης (high-throughput genetic screen). Στο σύστημα αυτό, θα παρακολουθήσουμε τον φθορισμό κυττάρων *E. coli* που παράγουν τη χιμαιρική πρωτεΐνη BR2-GFP, με ταυτόχρονη συνέκφραση της συνδυαστικής βιβλιοθήκης των παραλλαγών της Dj1A, και θα απομονώσουμε τα βακτηριακά εκείνα στελέχη που

επιδεικνύουν αυξημένα επίπεδα φθορισμού χρησιμοποιώντας φθορισμο-ενεργοποιούμενο κυτταροδιαχωριστή κυτταρομετρίας ροής (fluorescence-activated cell sorter, FACS). Το μεγάλο πλεονέκτημα του FACS είναι ότι πραγματοποιεί ταχύτατη και ποσοτική ανάλυση του φθορισμού ενός τεράστιου πληθυσμού κυττάρων (70.000 κύτταρα/sec). Αφού απομονωθούν τα στελέχη εκείνα που επιδεικνύουν αυξημένο φθορισμό, οι παραλλαγές που προκαλούν το φαινότυπο αυτό θα ταυτοποιηθούν με αλληλούχηση του μεταλλαγμένου γονιδίου *djlA*. Η αύξηση της παραγωγής της ανασυνδυασμένης BR2 θα επιβεβαιωθεί με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και ανάλυση κατά western. Η πιο αποτελεσματική παραλλαγή *DjlA* στο να προάγει τη βακτηριακή υπερέκφραση της BR2, θα χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή των βελτιστοποιημένων βακτηριακών στελεχών *E. coli* SuptoxD3.0.

Κεφάλαιο 7 - Συμπεράσματα μελέτης

Στη συγκεκριμένη μελέτη, στόχο μας αποτελούσε η ανάπτυξη βελτιστοποιημένων βακτηριακών στελεχών τα οποία να έχουν την ικανότητα να ανθίστανται στην υψηλή κυτταροτοξικότητα που προκαλεί η παραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών στον οργανισμό *E. coli*, καθώς και να υπερπαραγωγή προκαρυωτικές και ευκαρυωτικές διαμεμβρανικές πρωτεΐνες. Για το σκοπό αυτό, προβήκαμε σε όλες τις πιθανές ενέργειες οι οποίες θα εξασφάλιζαν τη βελτιστοποίηση των βακτηριακών στελεχών 1^{ns} γενιάς SuptoxD και SuptoxR, καθώς επίσης και την κατασκευή ενός νέου γενετικής τροποποιημένου *E. coli* στελέχους 2^{ns} γενιάς, του Suptox2.0.

Για τον σκοπό αυτό, στα πλαίσια αυτής της διατριβής, πραγματοποιήθηκαν τα εξής:

1. Συμμετείχα στην ανάπτυξη και στον χαρακτηρισμό δύο βακτηριακών στελεχών 1^{ns} γενιάς ονόματι SuptoxD και SuptoxR τα οποία χαρακτηρίζονται από ευεργετικές ικανότητες στην καταστολή της κυτταροτοξικότητας και στην παραγωγή αυξημένων ποσοτήτων ενός πλήθους διαφορετικών διαμεμβρανικών πρωτεϊνών με διαφορετικά χαρακτηριστικά (προέλευση, λειτουργία, μοριακά και τοπολογικά χαρακτηριστικά κ.α.) (Gialama et al. 2017a, Gialama et al. 2017b)⁹⁰,¹⁰⁷. Σε αυτά τα στελέχη, μελέτησα συστηματικά ένα εύρος διαφορετικών παραμέτρων καλλιέργειας (προσδιορισμός κατάλληλων συνθηκών υπερέκφρασης γονιδίων, θερμοκρασία και χρόνος υπερέκφρασης) με σκοπό την ανάπτυξη ενός νέου πρωτοκόλλου για την αύξηση στον μέγιστο βαθμό της παραγωγής σωστά αναδιπλωμένων και ενσωματωμένων στη μεμβράνη διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, (Michou et al. 2020b)¹⁵⁵.

Χρησιμοποιώντας τις βέλτιστες αυτές συνθήκες, διαπιστώσαμε πως τα στελέχη SuptoxD και SuptoxR είναι ικανά να παράξουν υψηλές ποσότητες, πλήρους μήκους, σωστά ενσωματωμένων στη μεμβράνη διαμεμβρανικών πρωτεϊνών (συγκριτικά με το στέλεχος αγρίου τύπου) σε ποσότητες επαρκείς για λειτουργικές και δομικές μελέτες. Επιπλέον, η διαδικασία της ετερόλογης παραγωγής με χρήση των SuptoxD και SuptoxR οδηγεί σε ομοιογενείς και σωστά αναδιπλωμένες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, οι οποίες διατηρούν τη δομική τους ακεραιότητα. Τέλος, διεπιστώθη πως τα στελέχη μας συσσωρεύουν υψηλά επίπεδα λειτουργικής διαμεμβρανικής πρωτεΐνης (Michou et al. 2019)¹²⁹.

2. Ανέπτυξα ένα νέο βακτηριακό στέλεχος 2^{ns} γενιάς, ονόματι SuptoxD2.0, το οποίο παράγει ακόμα πιο αυξημένες ποσότητες ποικίλων διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, συγκριτικά με το αρχικό στέλεχος SuptoxD. Η χρήση του στελέχους αυτού καθιστά δυνατή την παραγωγή υψηλής ποιότητας και ποσότητας διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, οι οποίες είναι κατάλληλες για λειτουργικές και δομικές μελέτες, όπως επίσης και περισσότερη λειτουργική διαμεμβρανική πρωτεΐνη (Michou et al. 2020a)¹⁵⁰.

3. Κατασκευάσα μία νέα, βελτιωμένη έκδοση του στελέχους SuptoxD, ονόματι SuptoxD*, και βρισκόμαστε στη διαδικασία χαρακτηρισμού του, καθώς επίσης και στη διαδικασία ανάπτυξης του στελέχους SuptoxD2.0* (Michou et al. in preparation).

Κεφάλαιο 8 - Υλικά και Μέθοδοι

8.1 Χημικά και αντιδραστήρια

Όλα τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για τη κατασκευή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων αγοράστηκαν από την εταιρεία New England Biolabs. Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το κιτ NucleoSpin Plasmid της εταιρείας Macherey-Nagel σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ο καθαρισμός των προϊόντων που προήλθαν από αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR products), καθώς και η απομόνωση DNA, το οποίο έχει προέλθει από ανάλυση ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης, πραγματοποιήθηκε με χρήση του κιτ Nucleospin Gel and PCR Clean-up της εταιρείας Macherey-Nagel. Τα θρεπτικά, τα αντιβιοτικά, η ανυδροτετρακυκλίνη καθώς και τα αντισώματα αγοράστηκαν από την εταιρεία Sigma. Η αραβινόζη (L(+)-arabinose) προήλθε από την εταιρεία PanReac AppliChem, το αντιδραστήριο της ρετινάλης (all-trans retinal) από την εταιρεία Cayman Chemical και το επιφανειοενεργό DDM (lauryl-β-D-maltoside) από την εταιρεία Glycon Biochemicals.

8.2 Εύρεση και ανάλυση των εξεταζόμενων DjIA αλληλουχιών

Οι DjIA πρωτεΐνες από τους οργανισμούς *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *Vibrio tapetis* επιλέχθηκαν βάσει βιβλιογραφίας^{108, 113}. Οι DjIA πρωτεΐνες από τους οργανισμούς *Salmonella enterica*, *Enterobacter gergoviae*, *Proteus mirabilis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas putida*, *Providencia stuartii* και *Serratia marcescens* εντοπίστηκαν μέσω του υπολογιστικού πακέτου NCBI BLASTp¹⁴⁹, όπου με βάση τη πρωτεϊνική αλληλουχία επερώτησης *E. coli* DjIA, πραγματοποιείται εύρεση τοπικών ομοιοτήτων ανάμεσα στην αλληλουχία αυτή και μιας βάσης δεδομένων πρωτεϊνικών αλληλουχιών, και στοιχισμός αυτών. Η DjIA πρωτεΐνη του οργανισμού *Yersinia pseudotuberculosis* μας έγινε γνωστή από τη Δρ. Elisabeth Carniel (Institute Pasteur of Paris).

Η ανάλυση της αμινοξικής ομολογίας των πρωτεϊνών και η κατασκευή του φυλογενετικού δένδρου έγινε με τη χρήση των προγραμμάτων Clustal Omega (EMBL-EBI)¹⁵⁶, Esript 3.0¹⁵⁷ και Mega X.^{158, 159} με χρήση της μεθόδου της Ελάχιστης εξέλιξης (Minimum Evolution method)¹⁶⁰. Το φυλογενετικό δένδρο είναι χωρίς ρίζα, και με μήκη κλάδων στις ίδιες μονάδες με τις φυλογενετικές αποστάσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του δένδρου. Οι φυλογενετικές αποστάσεις υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο διόρθωσης Poisson¹⁶¹ και βρίσκονται στις μονάδες των αριθμών των αμινοξικών υποκαταστάσεων ανά σημείο. Το δένδρο της της Ελάχιστης εξέλιξης αναζητήθηκε χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο Close-Neighbor-Interchange¹⁶², σε επίπεδο αναζήτησης 1. Ο αλγόριθμος Neighbor-joining¹⁶³ χρησιμοποιήθηκε για την

κατασκευή του αρχικού δένδρου. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε και το πρόγραμμα Adobe Illustrator CC 2018.

8.3 Κατασκευή πλασμιδίων

Ο πίνακας 1 αναγράφει αναλυτικά τις μεμβρανικές πρωτεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την μελέτη, ενώ ο πίνακας 2 όλους τους πλασμιδιακούς φορείς που κατασκευάστηκαν με τους εκκινητές που αναγράφονται στον πίνακα 3 προκειμένου να ενισχυθούν τα γονίδια (οι αλληλουχίες αναγράφονται στο σχήμα του παραρτήματος), να κλωνοποιηθούν και να κατασκευαστούν οι πλασμιδιακοί φορείς. Το πλασμίδιο pASKMscL-EGFP κατασκευάστηκε μετά από ενίσχυση με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) του γονιδίου *mscL* από το πλασμίδιο pJ411TbMscL (DNA 2.0) με χρήση των κατάλληλων εκκινητών. Εν συνεχεία, ακολούθησε πέψη του προϊόντος της αντίδρασης με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες XbaI και BamHI και κλωνοποίηση αυτού στο παρομοίως κομμένο πλασμίδιο pASKBR2-EGFP στην θέση του γονιδίου BR2. Τα πλασμίδια pASKHtdR και pASKMscL(F88C) προήλθαν ύστερα από ενίσχυση του γονιδίου *htdr* από το πλασμίδιο pHtdR200 και του γονιδίου MscL(F88C) από το πλασμίδιο pJ411TbMscL(F88C) χρησιμοποιώντας τους αντίστοιχους εκκινητές, πέψη και κλωνοποίηση του προϊόντος στον πλασμιδιακό φορέα pASK75 στις θέσεις XbaI και HindIII. Τα πλασμίδια pBAD33DjlA[untagged pBAD33DjlAs. *enterica*, pBAD33DjlAs. *enterica*[untagged], pBAD33DjlAP. *mirabilis*, pBAD33DjlAY. *pseudotuberculosis*, pBAD33DjlAV. *tapetis*, pBAD33DjlAA. *tumefaciens*, pBAD33DjlAP. *putida*, pBAD33DjlAP. *aeruginosa*, pBAD33DjlAK. *pneumoniae*, pBAD33DjlAP. *stuartii*, pBAD33DjlAS. *marcerscens*, and pBAD33DjlAE. *gergoviae*, που φέρουν κλωνοποιημένο το

γονίδιο *djlA*, προήλθαν έπειτα από ενίσχυση του γονιδίου με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης από γονιδιωματικό DNA ή πλασμιδιακό (*V. tapetis*) κάθε διαφορετικού οργανισμού με τους ανάλογους εκκινητές, πέψη με τα ένζυμα XbaI/HindIII και κλωνοποίηση του κάθε γονιδίου στον πλασμιδιακό φορέα pBAD33. Για την κατασκευή του πλασμιδιακού φορέα pBAD18DjlA ενισχύθηκε και κλωνοποιήθηκε το *E. coli* γονίδιο *djlA* στον πλασμιδιακό φορέα pBAD18 (Kan) (πίνακας 2) στις θέσεις XbaI/PstI. Η ενίσχυση του γονιδίου *djlA* έγινε με χρήση των εκκινητών DjlAFLfor και DjlAFLPstIR (πίνακας 3), και το προϊόν έφερε επίτοπο his στο καρβοξυτελικό του άκρο (C-terminus). Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε με χρήση των εκκινητών DjlAFLfor και DjlAPstIren (πίνακας 3) ούτως ώστε το προϊόν να μη φέρει επίτοπο his στο καρβοξυτελικό του άκρο. Αφότου προχωρήσαμε στις παραπάνω κλωνοποιήσεις, στείλαμε τους ανασυνδυασμένους πλασμιδιακούς φορείς για αλληλούχηση και επιβεβαιώθηκε η ορθότητά τους. Όλα τα πλασμίδια φέρουν βελτιστοποιημένη Shine-Dalgarno αλληλουχία και η ορθότητα των κατασκευών επαληθεύτηκε με αλληλούχηση DNA.

Πίνακας 1: Μεμβρανικές πρωτεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν

Διαμεμβρανική πρωτεΐνη	Οργανισμός	Λειτουργία	Αριθμός διαμεμβρανικών ελικών	Τοπολογία	Μέγεθος (kDa)
BR2	<i>Homo sapiens</i>	Υποδοχέας βραδυκινίνης 2 (GPCR)	7	N ^{out} -C ⁱⁿ	44.5
NTR1(D03)	<i>Rattus norvegicus</i>	Τροποποιημένος υποδοχέας νευροτενοΐνης 1 (D03) (GPCR)	7	N ^{out} -C ⁱⁿ	44.6
CB2	<i>Homo sapiens</i>	Περιφεριακός υποδοχέας κανναβινοειδών (GPCR)	7	N ^{out} -C ⁱⁿ	39.7
MscL	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Υψηλής αγωγιμότητας κανάλι ιόντων	2	N ⁱⁿ -C ⁱⁿ	16.0
HtdR	<i>Haloterrigena turkmenica</i>	Ροδοψίνη	7	N ^{out} -C ⁱⁿ	27.1
MotA	<i>E. coli</i>	Σταθερό στοιχείο του συμπλόκου του μηχανισμού των μαστιγίων	4	N ⁱⁿ -C ⁱⁿ	32.0

Πίνακας 2: Πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν

Πλασμίδιο	Πρωτεΐνη	Ανθεκτικότητα	Αρχή αντιγραφής	Αναφορά
pASKBR2-EGFP	FLAG-BR2-TEV-EGFP-His ₆	Amp ^R	ColE1	Gialama et al. ⁹⁰
pASKMotA-EGFP	FLAG-MotA-GFP-His ₈	Amp ^R	ColE1	Gialama et al. ⁹⁰
pASKNTR1(D03)-EGFP	FLAG-NTR1(D03)-TEV-EGFP-His ₆	Amp ^R	ColE1	Gialama et al. ⁹⁰
pASKCB2-GFP	FLAG-CB2-TEV-GFPmut2-His ₈	Amp ^R	ColE1	Gialama et al. ⁹⁰
pASKBR2	BR2-His ₆	Amp ^R	ColE1	Gialama et al. ⁹⁰
pASKMscL-EGFP	MscL-EGFP-His ₆	Amp ^R	ColE1	Παρούσα εργασία
pASKMscL(F88C)	MscL(F88C)-His ₆	Amp ^R	ColE1	Παρούσα εργασία
pASKHtdR	His6-HtdR-FLAG	Amp ^R	ColE1	Παρούσα εργασία
ASKA (modified pQE31)	All known <i>E. coli</i> proteins	Cm ^R	ColE1	Kitagawa et al. ⁸⁹
pSuptoxR (pBAD33rraA)	RraA-His ₈	Cm ^R	ACYC	Gialama et al. ⁹⁰

Πλασμιδίο	Πρωτεΐνη	Ανθεκτικότητα	Αρχή αντιγραφής	Αναφορά
pSuptoxR[untagged] (pBAD33RraA[untagged])	RraA	Cm ^R	ACYC	Παρούσα εργασία
pSuptoxD (pBAD33DjlA)	DjlA-His ₈	Cm ^R	ACYC	Gialama et al. ⁹⁰
pSuptoxD[untagged] (pBAD33DjlA[untagged])	DjlA	Cm ^R	ACYC	Παρούσα εργασία
pSuptoxD2.0 (pBAD33DjlA _{S. enterica})	DjlA _{S. enterica} -His ₈	Cm ^R	ACYC	Παρούσα εργασία
pSuptoxD2.0[untagged] (pBAD33DjlA _{S. enterica} [untagged])	DjlA _{S. enterica}	Cm ^R	ACYC	Παρούσα εργασία
pBAD33DjlA _{P. mirabilis}	DjlA _{P. mirabilis} - His ₈	Cm ^R	ACYC	Παρούσα εργασία
pBAD33DjlA _{Y.pseudotuberculosis}	DjlA _{Y.pseudotuberculosis} His ₈	Cm ^R	ACYC	Παρούσα εργασία

Πλασμιδιο	Πρωτεΐνη	Ανθεκτικότητα	Αρχή αντιγραφής	Αναφορά
pBAD33DjlA <i>v. tapetis</i>	DjlA <i>v. tapetis</i> -His8	Cm ^R	ACYC	Παρούσα εργασία
pBAD33DjlA <i>A. tumefaciens</i>	DjlA _A <i>tumefaciens</i> -His8	Cm ^R	ACYC	Παρούσα εργασία
pBAD33DjlA <i>P. putida</i>	DjlA _P <i>putida</i> -His8	Cm ^R	ACYC	Παρούσα εργασία
pBAD33DjlA <i>P. aeruginosa</i>	DjlA _P <i>aeruginosa</i> -His8	Cm ^R	ACYC	Παρούσα εργασία
pBAD33DjlA <i>K. pneumoniae</i>	DjlA _K <i>pneumoniae</i> -His8	Cm ^R	ACYC	Παρούσα εργασία
pBAD33DjlA <i>P. stuartii</i>	DjlA _P <i>stuartii</i> -His8	Cm ^R	ACYC	Παρούσα εργασία
pBAD33DjlA _S <i>S. marcescens</i>	DjlA _S <i>marcescens</i> -His8	Cm ^R	ACYC	Παρούσα εργασία
pBAD33DjlA _E <i>E. gergoviae</i>	DjlA _E <i>gergoviae</i> -His8	Cm ^R	ACYC	Παρούσα εργασία
pBAD18DjlA	DjlA-His8	Kan ^R	ACYC	Παρούσα εργασία
pET-BR2-GFP	FLAG-BR2-GFP-His8	Kan ^R	ColE1	Gialama et al. ⁹⁰
pET-MotA-GFP	FLAG-MotA-GFP-His8	Kan ^R	ColE1	Gialama et al. ⁹⁰

Πίνακας 3: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή (5'-3')
MscLwtM.tuberculosisFOR	AAAAATCTAGAAGGAGGAAACGATGTTGA AAGGCTTTAAAG
MscLwtM.tuberculosisREV	AAAAAGGATCCCTCGAGCTGGCTTTCGGT AG
MscLwtM.tuberculosisREV HISTAG (F88C)	AAAAAAAGCTTTTAGTGGTGATGGTGGTG ATGCTCGAGCTGG
HtdRFOR	AAAAAATCTAGAAGGAGGAAACGATGCAC CACCACCACCACCACCACCTGTTACGC TGCTCTAGCACC
HtdRREV	AAAAAAAGCTTTTACTTGTCTCATCGTCT TTGTAGTC GGTCGGGGCAGCCGTCGGCG
DjlA <i>S. enterica</i> for	AAAAAATCTAGAAGGAGGAAACGATGCAG TACTGGGGAAAAGATAAT
DjlA <i>S. enterica</i> rev	TTTTTTAAGCTTTTAGTGGTGGTGGTGGTG GTGGTGGTGCTTGAAGCCTTCTGTTCTTT GATT
DjlA_ <i>S. enterica</i> rev [untagged]	TTTTTTAAGCTTTTACTTGAAGCCTTCTG TTCTTTGATT
DjlA <i>P. mirabilis</i> for	AAAAAATCTAGAAGGAGGAAACGATGCGC TATTGGGGAAAATTATT
DjlA <i>P. mirabilis</i> rev	TTTTTTAAGCTTTTAGTGGTGGTGGTGGTG GTGGTGGTGACGAAATCCTTTTCTTTTTT AATC
DjlA <i>Y. pseudotuberculosis</i> for	AAAAAATCTAGAAGGAGGAAACGATGCGG TATTGGGGAAAACCTGCT
DjlA <i>Y. pseudotuberculosis</i> rev	TTTTTTAAGCTTTTAGTGGTGGTGGTGGTG GTGGTGGTGCTTAAATCCTTCTCACGTTT GATC
DjlA <i>V. tapetis</i> for	AAAAAATCTAGAAGGAGGAAACGATGCAC ATTTTGGCAAATTCT
DjlA <i>V. tapetis</i> rev	TTTTTTAAGCTTTTAGTGGTGGTGGTGGTG GTGGTGGTGTTTAAAGCCTTTTCTTTCTT AAGC
DjlA <i>A. tumefaciens</i> for	AAAAAATCTAGAAGGAGGAAACGATGATG TTCGATTTCCGCTGTTTGC
DjlA <i>A. tumefaciens</i> rev	TTTTTTAAGCTTTTAGTGGTGGTGGTGGTG GTGGTGGTGTCGACGCGCGTTCTTTCT CGATG
DjlA <i>P. putida</i> for	AAAAAATCTAGAAGGAGGAAACGATGTGG TGGCCAGGCACGGTGAT

8.4 Τυχαία μεταλλαξιγένεση μέσω επιρρεπούς-σε-σφάλμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (error-prone PCR)

Προκειμένου να κατασκευαστούν αρχικά συνδυαστικές βιβλιοθήκες πολλών εκατομμυρίων τυχαίων παραλλαγών της *DjlA*, το γονίδιο *djlA* υπεβλήθη σε τυχαία μεταλλαξιγένεση μέσω επιρρεπούς-σε-σφάλμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (error-prone PCR). Βάσει πρωτοκόλλου¹⁶⁴, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις PCR σε θερμοκυκλωτή με τελικό όγκο αντίδρασης 100 μ L για κάθε διαφορετικό ποσοστό επιθυμητής μεταλλαξιγένεσης όπως φαίνεται στον πίνακα 4. Για την κάθε αντίδραση ακολουθήθηκε το ίδιο πρόγραμμα PCR, καθώς και το ίδιο ζεύγος εκκινητών (*DjlAFLfor* & *DjlAFLrev*) όπως αναφέρεται και στον πίνακα 3.

Πρόγραμμα PCR

1. 95 °C for 1 min
2. 95 °C for 30 sec
3. 50 °C for 30 sec
4. 68 °C for 1 min 30 sec
5. Go to 2, 49 times
6. 68 °C for 10 min
7. 12 °C for 5 min
8. End

Το επιθυμητό ποσοστό μεταλλαξιγένεσης που επιθυμούσαμε να επιτύχουμε ήταν 0,4% σε αμινοξικό επίπεδο. Προκειμένου να δούμε σε ποια συνθήκη αντίδρασης PCR (βάσει του πίνακα 4) θα μπορούσαμε να έχουμε 0,4%, δοκιμάσαμε κάθε διαφορετική αντίδραση μεμονωμένα. Εν συνεχεία, το κάθε προϊόν (0,2%, 0,3%, 0,4% κοκ) υπεβλήθη σε πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες XbaI/HindIII και κλωνοποιήθηκε στις αντίστοιχες θέσεις στον πλασμιδιακό φορέα pBAD33. Όλοι οι διαφορετικοί κλώνοι που δημιουργήθηκαν (ο καθένας έφερε θεωρητικά και διαφορετικό ποσοστό μεταλλαξιγένεσης βάσει πρωτοκόλλου) στάθηκαν για αλληλούχιση προκειμένου να διαπιστώσουμε ποιοι έχουν υποστεί όντως μεταλλαξιγένεση και αν έχουν όντως υποστεί, να διαπιστώσουμε ποιος/οι πληρούν το επιθυμητό ποσοστό μεταλλαξιγένεσης. Μετά την αλληλούχιση, διαπιστώσαμε πως οι συνθήκες οι οποίες εξασφαλίζουν ποσοστό μεταλλαξιγένεσης ίσο με 1% σε νουκλεοτιδικό επίπεδο, σε αμινοξικό επίπεδο επιφέρουν 0,4% μεταλλαξιγένεση. Εν συνεχεία, πραγματοποιήσαμε πολλές αντιδράσεις PCR χρησιμοποιώντας τις ποσότητες των αντιδραστηρίων που αναφέρονται στον πίνακα 4 (ποσοστό μεταλλαξιγένεσης 1%), κι αφού ξαναστείλαμε ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα για αλληλούχιση, προχωρήσαμε σε δοκιμές προκειμένου να εξασφαλίσουμε την άριστη ποιότητα και τη μεγάλη συγκέντρωση των DNA, τόσο του πλασμιδιακού φορέα, όσο και των παραλλαγών *djlA* που πρόκειται να κλωνοποιηθούν.

Πίνακας 4: Ποσοστά επιθυμητής μεταλλαξιγένεσης και ποσότητες αντιδραστηρίων

Μεταλλαξιγένεση (%)	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,8	1,0	1,5
ddH ₂ O (μL)	54,2	54,8	50,2	46,8	42,8	35,2	48,6	39,2
dATP(10mM) (μL)	3,5	2,0	2,2	2,2	2,3	2,3	1,2	1,2
dCTP(10mM) (μL)	4,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	1,0	1,0
dGTP(10mM) (μL)	2,0	1,8	2,7	3,4	4,2	5,7	3,6	5,5
dTTP(100mM) (μL)	1,4	1,3	1,9	2,4	2,9	4,0	2,5	3,9
Template pDNA(μL)	2	2	2	2	2	2	2	2
Primers(μL)	2	2	2	2	2	2	2	2
BSA(0,1mg/μL) (μL)	-	5	5	5	5	5	5	5
MgCl ₂ (25mM) (μL)	10,0	8,2	11,0	13,3	15,8	20,8	13,1	19,3
Taq polymerase buffer(μL)	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
MnCl ₂ (5mM) (μL)	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Taq polymerase(μL)	1	1	1	1	1	1	1	1
Total volume(μL)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

8.5 Ενσωμάτωση γονιδίου στο γονιδιωματικό DNA

Προκειμένου να προχωρήσουμε στην ένθεση του γονιδίου *djlA* εντός του χρωμοσώματος, μελετήσαμε την κατανομή των ενδογενών γονιδίων στο χρωμόσωμα του *E. coli* (str. K-12, substr. MG1655) και επιλέξαμε μία περιοχή, όπου δεν εδράζονται γονίδια. Η περιοχή αυτή ορίζεται ως εξής: 59380-59600 (Σχήμα 45). Εν συνεχεία, σχεδιάστηκαν οι εκκινήτες *DjlA_CHROMfor* και *DjlA_CHROMrev* (πίνακας 3) οι οποίοι έφεραν ομολογία με την περιοχή του χρωμοσώματος όπου θα γίνει η ένθεση, καθώς και ομολογία με τον ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό φορέα *pBAD18DjlA* (πίνακας 2), ούτως ώστε να ενισχυθεί ο *araBAD* υποκινητής, το γονίδιο *djlA*, καθώς και το γονίδιο το οποίο προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό της καναμικίνης. Εν συνεχεία, MC1061 *E. coli* κύτταρα θα προετοιμαστούν κατάλληλα ώστε να γίνουν επιδεκτικά και θα μετασχηματιστούν με τον πλασμιδιακό φορέα *pKD46*¹⁵³ ο οποίος και κωδικοποιεί για το ένζυμο ρεκομπινάση του λ-φάγου. Το γραμμικό προϊόν, αφού πραγματοποιηθεί πέψη με περιοριστικό ένζυμο περιορισμού το οποίο θα το απαλλάσσει από τυχόν κυκλικό πλασμιδιακό φορέα *pBAD18DjlA*, θα εισαχθεί σε αυτά τα κύτταρα μετασχηματισμό, και μετά από τη δράση της ρεκομπινάσης, θα πραγματοποιηθεί ομόλογος ανασυνδυασμός και ένθεση του γραμμικού μορίου εντός του χρωμοσώματος στην επιλεγμένη περιοχή.

8.6 Βακτηριακά Στελέχη

Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε το *Escherichia coli* στέλεχος MC1061, εξαιρουμένων των περιπτώσεων που χρησιμοποιήθηκε και αναγράφεται κάποιο άλλο.

Ο πίνακας 5 αναγράφει αναλυτικά όλα τα στελέχη καθώς και τους γονοτύπους αυτών.

Πίνακας 5: Βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν

Στέλεχος	Γονότυπος	Πηγή
MC1061	$F^- \lambda^- \Delta(ara-leu)7697 [araD139] B/r \Delta(codB-lacI)3 galK16 galE15 e14^- mcrA0 relA1 rpsL150(Str^R) spoT1 mcrB1 hsdR2(r^-m^+)$	Casadaban et al. ¹⁶⁵
SuptoxD	$F^- \lambda^- \Delta(ara-leu)7697 [araD139] B/r \Delta(codB-lacI)3 galK16 galE15 e14^- mcrA0 relA1 rpsL150(Str^R) spoT1 mcrB1 hsdR2(r^-m^+)$ pSuptoxD	Gialama et al. ⁹⁰
SuptoxD2.0	$F^- \lambda^- \Delta(ara-leu)7697 [araD139] B/r \Delta(codB-lacI)3 galK16 galE15 e14^- mcrA0 relA1 rpsL150(Str^R) spoT1 mcrB1 hsdR2(r^-m^+)$ pSuptoxD2.0	Παρούσα εργασία
SuptoxR	$F^- \lambda^- \Delta(ara-leu)7697 [araD139] B/r \Delta(codB-lacI)3 galK16 galE15 e14^- mcrA0 relA1 rpsL150(Str^R) spoT1 mcrB1 hsdR2(r^-m^+)$ pSuptoxR	Gialama et al. ⁹⁰
Lemo21(DE3)	$F^- ompT gal dcm lon hsdSB (rB- mB-) \lambda (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) pLemo$	New England Biolabs
C41(DE3)	$F^- ompT gal dcm lon hsdSB (rB- mB-) \lambda (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])$ with modifications described by Kwon et al. (Kwon, Kim et al. 2015) and Schlegel et al. (Schlegel, Genevaux et al. 2015).	Lycigen
C43(DE3)	$F^- ompT gal dcm lon hsdSB (rB- mB-) \lambda (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])$ with modifications described by Kwon et al. (Kwon, Kim et al. 2015).	Lycigen
BW25113	F^- , $\Delta(araD-araB)567$, $\Delta lacZ4787(::rrnB-3)$, λ^- , $rph-1$, $\Delta(rhaD-rhaB)568$, $hsdR514$	Baba et al. ¹⁶⁶

BW25113 <i>djlA</i> (JW0054)	<i>F</i> ⁻ , Δ <i>djlA766::kan</i> , Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ4787(::rrnB-3)</i> , λ ⁻ , <i>rph-1</i> , Δ (<i>rhaD</i> - <i>rhaB</i>)568, <i>hsdR514</i>	Baba et al. ¹⁶⁶
BW25113 <i>rcsB</i> (JW2205)	<i>F</i> ⁻ , Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ4787(::rrnB-3)</i> , λ ⁻ , Δ <i>rcsB770::kan</i> , <i>rph-1</i> , Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR514</i>	Baba et al. ¹⁶⁶
BW25113 <i>rcsC</i> (JW5917)	<i>F</i> ⁻ , Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ4787(:rrnB-3)</i> , λ ⁻ , Δ <i>rcsC771::kan</i> , <i>rph-1</i> , Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR514</i>	Baba et al. ¹⁶⁶
W3110	<i>F</i> ⁻ λ ⁻ <i>rph-1</i> <i>INV(rrnD, rrnE)</i>	Bachmann et al. ¹⁶⁷
W3110 Δ DnaK	<i>W3110</i> Δ <i>DnaK52::CmR</i>	Perrody et al. ¹⁶⁸

8.7 Υπερέκφραση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών σε υγρές καλλιέργειες

Για την υπερπαραγωγή πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν αποικίες κυττάρων *E. coli* που προήλθαν από φρέσκους μετασχηματισμούς με τα αντίστοιχα κάθε φορά πλασμίδια. Μονές βακτηριακές αποικίες μεταφέρθηκαν σε υγρές καλλιέργειες LB οι οποίες περιείχαν κατάλληλο συνδυασμό αντιβιοτικών (100 µg/mL αμπικιλίνη, 40 µg/mL χλωραμφαινικόλη ή 50 µg/mL καναμυκίνη). Αυτές οι υγρές καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν για να εμβολιαστούν νέες υγρές καλλιέργειες με αραιώση 1:50 και με κατάλληλη ποσότητα αραβινόζης : 0.01% w/v για τα στελέχη MC1061, SuptoxD, SuptoxD2.0 και 0.2% w/v για το στέλεχος SuptoxR, εξαιρουμένων των περιπτώσεων που περιγράφεται διαφορετικά. Εν συνεχεία, οι καλλιέργειες αυτές αναπτύχθηκαν στους 30 °C με συνεχή ανάδευση στα 220rpm έως ότου η οπτική πυκνότητα (OD) των καλλιεργειών να φθάσει 0.5. Έπειτα από μείωση της θερμοκρασίας στους 25 °C και το πέρας μικρής χρονικής διάρκειας ούτως ώστε να εξισορροπηθεί η θερμοκρασία στον επωαστικό θάλαμο ανάδευσης, στις καλλιέργειες προστέθηκε 0.2 µg/mL ανυδροτετρακυκλίνης (aTc) ούτως ώστε να επαχθεί η παραγωγή των πρωτεϊνών για 16 ώρες (εκτός κι από τις περιπτώσεις που αναγράφεται και ακολουθείται άλλη προσέγγιση). Για την υπερπαραγωγή της πρωτεΐνης της ροδοψίνης, ακολουθήθηκε η ίδια ακριβώς διαδικασία με την διαφορά πως μαζί με την προσθήκη του επαγωγέα της ανυδροτετρακυκλίνης, προστέθηκε και ποσότητα ρετινάλης (10 µM all-trans-retinal) και η υπερπαραγωγή πραγματοποιήθηκε στο σκοτάδι για 16 ώρες.

8.8 Μέτρηση φθορισμού ανά όγκο καλλιέργειας σε πιάτα 96 πηγαδιών

Μετά το πέρας των 16 ωρών που χρειάζεται ώστε να παραχθούν οι πρωτεΐνες, 500μL από κάθε υγρή καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκαν σε 13000rpm για 1 λεπτό και ο κυτταρικός πληθυσμός που συγκεντρώθηκε, επαναιωρήθηκε σε 100 μL phosphate buffered saline pH=7.4 (PBS,1x). Το αιώρημα μεταφέρθηκε σε πιάτο μαύρου χρώματος με 96 πηγάδια (96 well plate) και μετρήθηκε ο φθορισμός της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP) που έφεραν οι μεμβρανοπρωτεΐνες έπειτα από διέγερση του φθοροφόρου στα 488nm. Εν συνεχεία, μετρήθηκε ο φθορισμός στα 510nm με χρήση του μηχανήματος TECAN SAFIRE plate reader.

8.9 Μέτρηση φθορισμού ανά κύτταρο με χρήση φθορισμο-ενεργοποιούμενου κυτταροδιαχωριστή κυτταρομετρίας ροής (fluorescence-activated cell sorter, FACS)

Προκειμένου να μετρηθεί ο φθορισμός ανά κύτταρο, 10^7 περίπου κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν σε 6000rpm για 2 λεπτά και ο κυτταρικός πληθυσμός που συγκεντρώθηκε, επαναιωρήθηκε σε 1mL φιλτραρισμένου διαλύματος phosphate buffered saline pH=7.4 (PBS,1x). Έπειτα, περίπου $5 \cdot 10^4$ κύτταρα οροθετήθηκαν εντός συγκεκριμένης περιοχής σε διάγραμμα παγίου σκεδασμού (side-scatter, SSC-H) με ευθύγραμμου σκεδασμού (forward-scatter, FSC-H) και αναλύθηκαν μέσω φθορισμο-ενεργοποιούμενου κυτταροδιαχωριστή κυτταρομετρίας ροής

(fluorescence-activated cell sorter, FACS) με τη χρήση του μηχανήματος Becton–Dickinson FACSAria system (BD Biosciences). Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με χρήση του προγράμματος FlowJo 7.6.2.

8.10 Απομόνωση μεμβρανών

Απομονώθηκαν μεμβράνες από καλλιέργειες 1L, εξαιρουμένων των περιπτώσεων που αναγράφεται κάτι διαφορετικό. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν έπειτα από φυγοκέντρηση στα 4000g για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 10mL κρύο ρυθμιστικό διάλυμα (300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, 15% γλυκερόλη, 5 mM διθειοθρεϊτόλη, pH 7.5) και λύθηκαν με χρήση υπερήχων σε πάγο. Ακολούθως συλλέχθηκε το υπερκείμενο μετά από φυγοκέντρηση στα 10000g για 15 λεπτά και υπεβλήθη σε υπερφυγοκέντρηση σε ρότορα Beckman 70Ti rotor στα 42,000 rpm (130,000 x g) για 1 ώρα στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και οι μεμβράνες που συλλέχθηκαν ομογενοποιήθηκαν σε 5 mL κρύου ρυθμιστικού διαλύματος.

8.11 Απομόνωση ροδοψίνης από κυτταρικές μεμβράνες και ποσοτικοποίηση

Κύτταρα που συλλέχθηκαν από 250mL καλλιέργειας (στη περίπτωση που η ροδοψίνη επρόκειτο να υποβληθεί σε διαδοχικούς καθαρισμούς, τα κύτταρα που συλλέχθηκαν ήταν από καλλιέργειες 1 L) επαναιωρήθηκαν σε 7.5mL κρύου ρυθμιστικού διαλύματος λύσης. Έπειτα, τα κύτταρα λύθηκαν με χρήση υπερήχων σε πάγο και η ροδοψίνη απομονώθηκε από τα κύτταρα με χρήση επιφανειοενεργού 2.5% (w/v) DDM (lauryl-β-D-maltoside) καθώς και 0.1 mM

φαινυλμεθυλοσοφονυλοφθοριδίου (PMSF) με συνεχή ανάδευση (roller mixer) στα 180 rpm για 24 ώρες στους 4 °C στο σκοτάδι. Το δείγμα μετά το πέρας των 24 ωρών υπερφυγοκεντρήθηκε σε ρότορα Beckman 70Ti rotor στα 42,000 rpm (130,000 x g) για 1 ώρα στους 4 °C. Στην περίπτωση που το καθιζάνον κυτταρικό κλάσμα που συγκεντρώθηκε ήταν άχρωμο, το υπερκείμενο περιείχε την εν λόγω πρωτεΐνη, οπότε και συλλέχθηκε. Τέλος, μετρήθηκε η απορρόφηση της πρωτεΐνης στα 550nm.

8.12 Απομόνωση ροδοψίνης με χρήση χρωματογραφίας συγγένειας και ταχείας υγρής χρωματογραφίας πρωτεϊνών (σύστημα AKTA-FPLC)

Για τον καθαρισμό με χρήση χρωματογραφίας συγγένειας Ni⁺² (IMAC- Immobilized Metal- Affinity Chromatography) στους 4 °C, το υπερκείμενο αναμιχθηκε με 1mL ρητίνη Ni-NTA αγαρόζης (beads) (Qiagen, Germany) (τα οποία είχαν ξεπλυθεί πριν τη χρήση τους με κρύο ρυθμιστικό διάλυμα) for 1 ώρα στους 4 °C με συνεχή ανάδευση στα 180 rpm (roller mixer) ούτως ώστε η πρωτεΐνη που έφερε επίτοπο 6 ιστιδινών (HIS-tagged) να συνδεθεί με τα beads πριν φορτωθεί σε κολώνα χρωματογραφίας χωρητικότητας 5mL (polypropylene chromatography column, Pierce, USA). Το κλάσμα εκείνο που εξερχόταν από το κάτω μέρος της κολώνας (flow through fraction) συλλέχθηκε και επαναφορτώθηκε στην κολώνα. Η διαδικασία επαναλήφθηκε 6 φορές μέχρις ότου το flow through fraction ήταν άχρωμο, εξασφαλίζοντας έτσι την μέγιστη πρόοδεση της πρωτεΐνης. Στη συνέχεια, στην κολώνα προστέθηκαν 40 mL διαλύματος πλύσης (wash buffer_50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, 0.1% (w/v) DDM, pH 8.0) και η πρωτεΐνη

εκλούστηκε με 6mL διαλύματος εκλούσεως (elution buffer_50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, 0.1% (w/v) DDM, pH 8.0). Η απομονωμένη πρωτεΐνη συμπυκνώθηκε στα 600 μL με χρήση κολώνας συμπυκνώσεως 10K σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Unit_10 KDa cutoff). Ακολούθως, η συμπυκνωμένη πρωτεΐνη καθαρίστηκε περαιτέρω με χρωματογραφία ταχείας υγρής χρωματογραφίας μέσω στήλης HiLoad 16/600 Superdex 200 column (GE Healthcare, USA). Η στήλη, πριν τη χρήση της, είχε εξισορροπηθεί με φιλτραρισμένο διάλυμα phosphate buffered saline (PBS, 1x) το οποίο περιείχε και 0,1% (w/v) DDM. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον καθαρισμό της ροδοψίνης που παρήχθη στα *E. coli* στελέχη Wild type, SuptoxD και SuptoxD2.0 ήταν ακριβώς η ίδια. Η απομονωμένη πρωτεΐνη σε κάθε περίπτωση ποσοτικοποιήθηκε από την απορρόφηση της κορυφής που δημιουργήθηκε κατά τη διαδικασία και τον συντελεστή μοριακής απορρόφησης της πρωτεΐνης (extinction coefficient_{HtdR} (ε₂₈₀) = 62910 M⁻¹ cm⁻¹).

8.13 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE), ανάλυση ενδοπηκτικού φθορισμού (in-gel fluorescence analysis) και ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blot)

Προκειμένου οι πρωτεΐνες να αναλυθούν με βάση το μοριακό τους βάρος πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση τους σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE) 12-15% με πρότερο βράσιμο των δειγμάτων

για 10 λεπτά στους 100 °C όταν αυτά προορίζονταν για ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blot) ή χωρίς βράσιμο εάν τα δείγματα θα αναλύονταν για ενδοπηκτικό φθορισμό (in-gel fluorescence analysis) πριν το Western blot. Η ανάλυση ενδοπηκτικού φθορισμού ακολούθησε την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό ημιαποδιατακτικές συνθήκες. Κατόπιν, ακολούθησε η ανάλυση ενδοπηκτικού φθορισμού στο σύστημα UVP ChemiDoc-It² Imaging System, το οποίο διαθέτει CCD camera και φίλτρο GFP, μετά από έκθεση για περίπου 3 δευτερόλεπτα.

Μετά την ανάλυση των πρωτεϊνών (έχοντας ή μη αναλυθεί με ενδοπηκτικό φθορισμό) ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blot) όπου οι πρωτεΐνες από την πηκτή μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη πολυβινυλιδενίου (PVDF membrane_Merck) για 45 min στα 12 V σε semi-dry συσκευή μεταφοράς (Thermo Scientific). Οι μεμβράνες εν συνεχεία τοποθετήθηκαν και ανακινήθηκαν σε διάλυμα γάλακτος 0,5% w/v σε Tris-buffered saline με 0.1% v/v Tween-20 (TBST) για 1 ώρα. Για την ανίχνευση των πρωτεϊνών, οι μεμβράνες, μετά από τριπλή πλύση με διάλυμα Tris-buffered saline με 0.1% v/v Tween-20 (TBST), επώαστηκαν σε αντισώματα με συνεχή ανάδευση για 1 ώρα. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής: μονοκλωνικό αντι-πολυιστιδινικό αντίσωμα επιμύος αντι-HIS (Sigma) σε αραιώση 1:3,000 συζευγμένο με υπεροξειδάση χρένου (HRP), ένα αντι-FLAG αντίσωμα επιμύος (Sigma) σε αραιώση 1:1,000, και ως δευτερογές χρησιμοποιήθηκε αντι-MOUSE αντίσωμα σε αραιώση 1:5,000 συζευγμένο με υπεροξειδάση χρένου (HRP). Ακολούθησε τριπλή πλύση με διάλυμα TBST, και οι πρωτεΐνες οπτικοποιήθηκαν με τη συσκευή ChemiDoc-It² Imaging System (UVP).

8.14 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Όλα τα διαγράμματα έγιναν με χρήση του προγράμματος using SigmaPlot (Systat Software Inc. Ver. 10. Systat Software, Point Richmond, CA, USA). Τα δεδομένα από όλα τα πειράματα αντιστοιχούν στον μέσο όρο ενός έως 3 ανεξαρτήτων πειραμάτων, καθένα από τα οποία αντιστοιχούν σε τουλάχιστον 3 διαφορετικές δοκιμές, εκτός κι αν ορίζεται διαφορετικά. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με χρήση των προγραμμάτων Prism και Microsoft Office 2003 Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). Οι μέσοι όροι συγκρίθηκαν με χρήση μη-ζευγοποιημένων t-tests (unpaired t-tests). Τα σφάλματα στη τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, ns (μη σημαντική διαφορά) > 0.05 .

Κεφάλαιο 9 - Βιβλιογραφία

1. Allen, J. P., Recent innovations in membrane-protein structural biology. *F1000Research* **2019**, *8*.
2. Gromiha, M. M.; Ou, Y.-Y., Bioinformatics approaches for functional annotation of membrane proteins. *Briefings in bioinformatics* **2014**, *15* (2), 155-168.
3. White, S. H.; Wimley, W. C., Membrane protein folding and stability: physical principles. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **1999**, *28* (1), 319-365.
4. Schulz, G. E., Transmembrane beta-barrel proteins. *Advances in protein chemistry* **2003**, *63*, 47-70.
5. Von Heijne, G., The membrane protein universe: what's out there and why bother? *Journal of internal medicine* **2007**, *261* (6), 543-557.
6. Jung, S.-j.; Jung, Y.; Kim, H., Proper insertion and topogenesis of membrane proteins in the ER depend on Sec63. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **2019**, *1863* (9), 1371-1380.
7. Saier Jr, M. H.; Tran, C. V.; Barabote, R. D., TCDB: the Transporter Classification Database for membrane transport protein analyses and information. *Nucleic acids research* **2006**, *34* (suppl_1), D181-D186.
8. Dutzler, R.; Campbell, E. B.; MacKinnon, R., Gating the selectivity filter in CIC chloride channels. *Science* **2003**, *300* (5616), 108-112.
9. Czaplá, M.; Sarewicz, M.; Osyczka, A., Fusing proteins as an approach to study bioenergetic enzymes and processes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **2012**, *1817* (10), 1847-1851.
10. Kahaki, F. A.; Monzavi, S.; Bamehr, H.; Bandani, E.; Payandeh, Z.; Jahangiri, A.; Khalili, S., Expression and Purification of Membrane Proteins in Different Hosts. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* **2020**, 1-11.
11. Gutierrez, A. N.; McDonald, P. H., GPCRs: Emerging anti-cancer drug targets. *Cellular signalling* **2018**, *41*, 65-74.
12. Kumari, P.; Ghosh, E.; Shukla, A. K., Emerging approaches to GPCR ligand screening for drug discovery. *Trends in molecular medicine* **2015**, *21* (11), 687-701.
13. Heldin, C.-H.; Lu, B.; Evans, R.; Gutkind, J. S., Signals and receptors. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2016**, *8* (4), a005900.
14. Ma, P.; Zimmel, R., Value of novelty? Nature Publishing Group: 2002.
15. Kühlbrandt, W., Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC biology* **2015**, *13* (1), 89.
16. Bank, P. D., Protein data bank. *Nature New Biol* **1971**, *233*, 223.
17. Wagner, S.; Bader, M. L.; Drew, D.; de Gier, J. W., Rationalizing membrane protein overexpression. *Trends in biotechnology* **2006**, *24* (8), 364-71.
18. Wlodawer, A.; Dauter, Z.; Jaskolski, M.; Brzozowski, M., Protein crystallography: Methods and protocols. **2017**.
19. De Zorzi, R.; Mi, W.; Liao, M.; Walz, T., Single-particle electron microscopy in the study of membrane protein structure. *Journal of Electron Microscopy* **2015**, *65* (1), 81-96.
20. Bill, R. M.; Henderson, P. J.; Iwata, S.; Kunji, E. R.; Michel, H.; Neutze, R.; Newstead, S.; Poolman, B.; Tate, C. G.; Vogel, H., Overcoming barriers to membrane protein structure determination. *Nature biotechnology* **2011**, *29* (4), 335-340.
21. Milić, D.; Veprintsev, D. B., Large-scale production and protein engineering of G protein-coupled receptors for structural studies. *Frontiers in pharmacology* **2015**, *6*, 66.

22. Kang, H. J.; Lee, C.; Drew, D., Breaking the barriers in membrane protein crystallography. *The international journal of biochemistry & cell biology* **2013**, *45* (3), 636-644.
23. Sarramegna, V.; Talmont, F.; Demange, P.; Milon, A., Heterologous expression of G-protein-coupled receptors: comparison of expression systems from the standpoint of large-scale production and purification. *Cell Mol Life Sci* **2003**, *60* (8), 1529-46.
24. Schlegel, S.; Hjelm, A.; Baumgarten, T.; Vikström, D.; de Gier, J.-W., Bacterial-based membrane protein production. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* **2014**, *1843* (8), 1739-1749.
25. Zhu, D.; Fu, Y.; Liu, F.; Xu, H.; Saris, P. E. J.; Qiao, M., Enhanced heterologous protein productivity by genome reduction in *Lactococcus lactis* NZ9000. *Microbial cell factories* **2017**, *16* (1), 1.
26. Taguchi, S.; Ooi, T.; Mizuno, K.; Matsusaki, H., Advances and needs for endotoxin-free production strains. *Applied microbiology and biotechnology* **2015**, *99* (22), 9349-9360.
27. King, M. S.; Boes, C.; Kunji, E. R., Membrane protein expression in *Lactococcus lactis*. In *Methods in enzymology*, Elsevier: 2015; Vol. 556, pp 77-97.
28. Marreddy, R. K.; Pinto, J. P.; Wolters, J. C.; Geertsma, E. R.; Fusetti, F.; Permentier, H. P.; Kuipers, O. P.; Kok, J.; Poolman, B., The response of *Lactococcus lactis* to membrane protein production. *PLoS One* **2011**, *6* (8).
29. Tripodi, F.; Nicastro, R.; Reghellin, V.; Coccetti, P., Post-translational modifications on yeast carbon metabolism: regulatory mechanisms beyond transcriptional control. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **2015**, *1850* (4), 620-627.
30. Kodedova, M.; Sychrova, H., Changes in the sterol composition of the plasma membrane affect membrane potential, salt tolerance and the activity of multidrug resistance pumps in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* **2015**, *10* (9).
31. Dalton, A. C.; Barton, W. A., Over-expression of secreted proteins from mammalian cell lines. *Protein science* **2014**, *23* (5), 517-525.
32. Zhu, J., Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. *Biotechnology advances* **2012**, *30* (5), 1158-1170.
33. Fortin, J.-P.; Dziadulewicz, E. K.; Gera, L.; Marceau, F., A nonpeptide antagonist reveals a highly glycosylated state of the rabbit kinin B1 receptor. *Molecular pharmacology* **2006**, *69* (4), 1146-1157.
34. Mansouri, M.; Berger, P., Baculovirus for gene delivery to mammalian cells: Past, present and future. *Plasmid* **2018**, *98*, 1-7.
35. G Aucoin, M.; A Mena, J.; A Kamen, A. J. C. g. t., Bioprocessing of baculovirus vectors: a review. **2010**, *10* (3), 174-186.
36. Kofuku, Y.; Yokomizo, T.; Imai, S.; Shiraishi, Y.; Natsume, M.; Itoh, H.; Inoue, M.; Nakata, K.; Igarashi, S.; Yamaguchi, H., Deuteration and selective labeling of alanine methyl groups of β 2-adrenergic receptor expressed in a baculovirus-insect cell expression system. *Journal of biomolecular NMR* **2018**, *71* (3), 185-192.
37. Abdelrasoul, A.; Doan, H.; Lohi, A., *Biomimetic and Bioinspired Membranes for New Frontiers in Sustainable Water Treatment Technology*. BoD—Books on Demand: 2017.
38. Goosen, M. F., *Insect cell culture engineering*. CRC Press: 2020.
39. Weber, W.; Weber, E.; Geisse, S.; Memmert, K. J. C., Optimisation of protein expression and establishment of the Wave Bioreactor for Baculovirus/insect cell culture. **2002**, *38* (1-3), 77-85.
40. Kuruma, Y.; Ueda, T., The PURE system for the cell-free synthesis of membrane proteins. *Nature protocols* **2015**, *10* (9), 1328.

41. Feng, P.; Weagant, S. D.; Grant, M. A.; Burkhardt, W.; Shellfish, M.; Water, B., BAM: Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria. *Bacteriological analytical manual* **2002**, *13*.
42. Jeong, H.; Barbe, V.; Lee, C. H.; Vallenet, D.; Yu, D. S.; Choi, S.-H.; Couloux, A.; Lee, S.-W.; Yoon, S. H.; Cattolico, L., Genome sequences of Escherichia coli B strains REL606 and BL21 (DE3). *Journal of molecular biology* **2009**, *394* (4), 644-652.
43. Blattner, F. R.; Plunkett, G.; Bloch, C. A.; Perna, N. T.; Burland, V.; Riley, M.; Collado-Vides, J.; Glasner, J. D.; Rode, C. K.; Mayhew, G. F., The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. *science* **1997**, *277* (5331), 1453-1462.
44. Makino, T.; Skretas, G.; Georgiou, G., Strain engineering for improved expression of recombinant proteins in bacteria. *Microb Cell Fact* **2011**, *10*, 32.
45. Dilworth, M. V.; Piel, M. S.; Bettaney, K. E.; Ma, P.; Luo, J.; Sharples, D.; Poyner, D. R.; Gross, S. R.; Moncoq, K.; Henderson, P. J., Microbial expression systems for membrane proteins. *Methods* **2018**, *147*, 3-39.
46. Rose, G. D.; Roy, S., Hydrophobic basis of packing in globular proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1980**, *77* (8), 4643-4647.
47. Jahn, T. R.; Radford, S. E., The Yin and Yang of protein folding. *The FEBS journal* **2005**, *272* (23), 5962-5970.
48. Kim, Y. E.; Hipp, M. S.; Bracher, A.; Hayer-Hartl, M.; Ulrich Hartl, F., Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annual review of biochemistry* **2013**, *82*, 323-355.
49. Bogdanov, M.; Dowhan, W., Lipid-assisted protein folding. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274* (52), 36827-36830.
50. Calloni, G.; Chen, T.; Schermann, S. M.; Chang, H.-c.; Genevoux, P.; Agostini, F.; Tartaglia, G. G.; Hayer-Hartl, M.; Hartl, F. U., DnaK functions as a central hub in the E. coli chaperone network. *Cell reports* **2012**, *1* (3), 251-264.
51. Castanié-Cornet, M.-P.; Bruel, N.; Genevoux, P., Chaperone networking facilitates protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* **2014**, *1843* (8), 1442-1456.
52. Luirink, J.; Heijne, G. v.; Houben, E.; Gier, J.-W. d. J. A. R. M., Biogenesis of inner membrane proteins in Escherichia coli. **2005**, *59*, 329-355.
53. Niesen, M. J.; Zimmer, M. H.; Miller III, T. F. J. J. o. t. A. C. S., Dynamics of co-translational membrane protein integration and translocation via the Sec translocon. **2020**, *142* (12), 5449-5460.
54. Driessen, A. J.; Nouwen, N., Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77*, 643-667.
55. Rapoport, T. A. J. N., Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. **2007**, *450* (7170), 663-669.
56. Bibi, E. J. B. e. B. A.-B., Early targeting events during membrane protein biogenesis in Escherichia coli. **2011**, *1808* (3), 841-850.
57. Sakaguchi, M.; Tomiyoshi, R.; Kuroiwa, T.; Mihara, K.; Omura, T., Functions of signal and signal-anchor sequences are determined by the balance between the hydrophobic segment and the N-terminal charge. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1992**, *89* (1), 16-19.
58. Cross, B. C.; Sinning, I.; Luirink, J.; High, S., Delivering proteins for export from the cytosol. *Nature reviews Molecular cell biology* **2009**, *10* (4), 255-264.
59. Valent, Q. A.; Kendall, D.; High, S.; Kusters, R.; Oudega, B.; Luirink, J., Early events in preprotein recognition in E. coli: interaction of SRP and trigger factor with nascent polypeptides. *The EMBO journal* **1995**, *14* (22), 5494-5505.

60. Miller, J. D.; Bernstein, H. D.; Walter, P., Interaction of E. coli Ffh/4.5 S ribonucleoprotein and FtsY mimics that of mammalian signal recognition particle and its receptor. *Nature* **1994**, *367* (6464), 657-659.
61. Kusters, R.; Lentzen, G.; Eppens, E.; van Geel, A.; van der Weijden, C. C.; Wintermeyer, W.; Luirink, J., The functioning of the SRP receptor FtsY in protein-targeting in E. coli is correlated with its ability to bind and hydrolyse GTP. *FEBS letters* **1995**, *372* (2-3), 253-258.
62. Welte, T.; Kudva, R.; Kuhn, P.; Sturm, L.; Braig, D.; Müller, M.; Warscheid, B.; Drepper, F.; Koch, H.-G., Promiscuous targeting of polytopic membrane proteins to SecYEG or YidC by the Escherichia coli signal recognition particle. *Molecular biology of the cell* **2012**, *23* (3), 464-479.
63. Blobel, G., Intracellular protein topogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1980**, *77* (3), 1496-1500.
64. von Heijne, G., The distribution of positively charged residues in bacterial inner membrane proteins correlates with the trans-membrane topology. *The EMBO journal* **1986**, *5* (11), 3021-3027.
65. Woodall, N. B.; Hadley, S.; Yin, Y.; Bowie, J. U., Complete topology inversion can be part of normal membrane protein biogenesis. *Protein Science* **2017**, *26* (4), 824-833.
66. Wagner, S.; Baars, L.; Ytterberg, A. J.; Klussmeier, A.; Wagner, C. S.; Nord, O.; Nygren, P. A.; van Wijk, K. J.; de Gier, J. W., Consequences of membrane protein overexpression in Escherichia coli. *Mol Cell Proteomics* **2007**, *6* (9), 1527-50.
67. Miroux, B.; Walker, J. E., Over-production of proteins in Escherichia coli: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol* **1996**, *260* (3), 289-98.
68. Gubellini, F.; Verdon, G.; Karpowich, N. K.; Luff, J. D.; Boel, G.; Gauthier, N.; Handelman, S. K.; Ades, S. E.; Hunt, J. F., Physiological response to membrane protein overexpression in E. coli. *Mol Cell Proteomics* **2011**, *10* (10), M111 007930.
69. Kwon, S.-K.; Kim, S. K.; Lee, D.-H.; Kim, J. F., Comparative genomics and experimental evolution of Escherichia coli BL21 (DE3) strains reveal the landscape of toxicity escape from membrane protein overproduction. *Scientific reports* **2015**, *5*, 16076.
70. White, S. H.; Wimley, W. C., Hydrophobic interactions of peptides with membrane interfaces. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes* **1998**, *1376* (3), 339-352.
71. Wagner, S.; Klepsch, M. M.; Schlegel, S.; Appel, A.; Draheim, R.; Tarry, M.; Hogbom, M.; van Wijk, K. J.; Slotboom, D. J.; Persson, J. O.; de Gier, J. W., Tuning Escherichia coli for membrane protein overexpression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105* (38), 14371-6.
72. Klepsch, M. M.; Persson, J. O.; De Gier, J.-W. L., Consequences of the overexpression of a eukaryotic membrane protein, the human KDEL receptor, in Escherichia coli. *Journal of molecular biology* **2011**, *407* (4), 532-542.
73. Dong, H.; Nilsson, L.; Kurland, C. G., Gratuitous overexpression of genes in Escherichia coli leads to growth inhibition and ribosome destruction. *Journal of bacteriology* **1995**, *177* (6), 1497-1504.
74. Skretas, G.; Georgiou, G., Genetic analysis of G protein-coupled receptor expression in Escherichia coli: inhibitory role of DnaJ on the membrane integration of the human central cannabinoid receptor. *Biotechnol Bioeng* **2009**, *102* (2), 357-67.
75. Massey-Gendel, E.; Zhao, A.; Boulting, G.; Kim, H. Y.; Balamotis, M. A.; Seligman, L. M.; Nakamoto, R. K.; Bowie, J. U., Genetic selection system for improving recombinant membrane protein expression in E. coli. *Protein Science* **2009**, *18* (2), 372-383.

76. Link, A. J.; Skretas, G.; Strauch, E. M.; Chari, N. S.; Georgiou, G., Efficient production of membrane-integrated and detergent-soluble G protein-coupled receptors in *Escherichia coli*. *Protein Sci* **2008**, *17* (10), 1857-63.
77. Waldo, G. S., Improving protein folding efficiency by directed evolution using the GFP folding reporter. In *Directed Enzyme Evolution*, Springer: 2003; pp 343-359.
78. Nannenga, B. L.; Baneyx, F., Reprogramming chaperone pathways to improve membrane protein expression in *Escherichia coli*. *Protein Science* **2011**, *20* (8), 1411-1420.
79. Bäcklund, E.; Ignatushchenko, M.; Larsson, G., Suppressing glucose uptake and acetic acid production increases membrane protein overexpression in *Escherichia coli*. *Microbial cell factories* **2011**, *10* (1), 35.
80. Schlegel, S.; Genevaux, P.; de Gier, J.-W., De-convoluting the genetic adaptations of *E. coli* C41 (DE3) in real time reveals how alleviating protein production stress improves yields. *Cell reports* **2015**, *10* (10), 1758-1766.
81. Chamberlin, M.; Mcgrath, J.; Waskell, L., New RNA polymerase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T7. *Nature* **1970**, *228* (5268), 227-231.
82. Iost, I.; Guillerez, J.; Dreyfus, M., Bacteriophage T7 RNA polymerase travels far ahead of ribosomes in vivo. *Journal of bacteriology* **1992**, *174* (2), 619-622.
83. Wanner, B. L.; Kodaira, R.; Neidhart, F., Physiological regulation of a decontrolled lac operon. *Journal of bacteriology* **1977**, *130* (1), 212-222.
84. Schlegel, S.; Lofblom, J.; Lee, C.; Hjelm, A.; Klepsch, M.; Strous, M.; Drew, D.; Slotboom, D. J.; de Gier, J. W., Optimizing membrane protein overexpression in the *Escherichia coli* strain Lemo21(DE3). *J Mol Biol* **2012**, *423* (4), 648-59.
85. Baumgarten, T.; Schlegel, S.; Wagner, S.; Löw, M.; Eriksson, J.; Bonde, I.; Herrgård, M. J.; Heipieper, H. J.; Nørholm, M. H.; Slotboom, D. J., Isolation and characterization of the *E. coli* membrane protein production strain Mutant56 (DE3). *Scientific reports* **2017**, *7*, 45089.
86. Studier, F. W., Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein expression and purification* **2005**, *41* (1), 207-234.
87. Skretas, G.; Makino, T.; Varadarajan, N.; Pogson, M.; Georgiou, G., Multi-copy genes that enhance the yield of mammalian G protein-coupled receptors in *Escherichia coli*. *Metab Eng* **2012**, *14* (5), 591-602.
88. Skretas, G.; Georgiou, G., A simple genetic selection for the isolation of overexpressed genes that enhance the accumulation of membrane-integrated human G protein-coupled receptors in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **2010**.
89. Kitagawa, M.; Ara, T.; Arifuzzaman, M.; Ioka-Nakamichi, T.; Inamoto, E.; Toyonaga, H.; Mori, H., Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library (A Complete Set of *E. coli* K-12 ORF Archive): Unique Resources for Biological Research. *DNA research* **2005**, *12* (5), 291-299.
90. Gialama, D.; Kostelidou, K.; Michou, M.; Delivoria, D. C.; Kollis, F. N.; Skretas, G., Development of *Escherichia coli* Strains That Withstand Membrane Protein-Induced Toxicity and Achieve High-Level Recombinant Membrane Protein Production. *ACS Synth Biol* **2017**, *6* (2), 284-300.
91. Drew, D. E.; von Heijne, G.; Nordlund, P.; de Gier, J. W., Green fluorescent protein as an indicator to monitor membrane protein overexpression in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **2001**, *507* (2), 220-4.
92. Drew, D.; Lerch, M.; Kunji, E.; Slotboom, D. J.; de Gier, J. W., Optimization of membrane protein overexpression and purification using GFP fusions. *Nat Methods* **2006**, *3* (4), 303-13.
93. Wistrand, M.; Käll, L.; Sonnhammer, E. L., A general model of G protein-coupled receptor sequences and its application to detect remote homologs. *Protein science* **2006**, *15* (3), 509-521.

94. Kampinga, H. H.; Andreasson, C.; Barducci, A.; Cheetham, M. E.; Cyr, D.; Emanuelsson, C.; Genevoux, P.; Gestwicki, J. E.; Goloubinoff, P.; Huerta-Cepas, J., Function, evolution, and structure of J-domain proteins. *Cell Stress and Chaperones* **2019**, *24* (1), 7-15.
95. Craig, E. A.; Weissman, J. S.; Horwich, A. L., Heat shock proteins and molecular chaperones: mediators of protein conformation and turnover in the cell. *Cell* **1994**, *78* (3), 365-372.
96. Kampinga, H. H.; Craig, E. A., The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nature reviews Molecular cell biology* **2010**, *11* (8), 579-592.
97. Genevoux, P.; Georgopoulos, C.; Kelley, W. L., The Hsp70 chaperone machines of *Escherichia coli*: a paradigm for the repartition of chaperone functions. *Molecular microbiology* **2007**, *66* (4), 840-57.
98. BUKAU, B.; REILLY, P.; MCCARTY, J.; WALKER, G. C., Immunogold localization of the DnaK heat shock protein in *Escherichia coli* cells. *Microbiology* **1993**, *139* (1), 95-99.
99. Mayer, M. P.; Rüdiger, S.; Bukau, B., Molecular basis for interactions of the DnaK chaperone with substrates. *Biological chemistry* **2000**, *381* (9-10), 877-885.
100. Hesterkamp, T.; Bukau, B., Role of the DnaK and HscA homologs of Hsp70 chaperones in protein folding in *E. coli*. *The EMBO journal* **1998**, *17* (16), 4818-4828.
101. Kityk, R.; Kopp, J.; Mayer, M. P., Molecular mechanism of J-domain-triggered ATP hydrolysis by Hsp70 chaperones. *Molecular cell* **2018**, *69* (2), 227-237. e4.
102. Mayer, M. P., Hsp70 chaperone dynamics and molecular mechanism. *Trends in biochemical sciences* **2013**, *38* (10), 507-514.
103. Wittung-Stafshede, P.; Guidry, J.; Horne, B. E.; Landry, S. J., The J-domain of Hsp40 couples ATP hydrolysis to substrate capture in Hsp70. *Biochemistry* **2003**, *42* (17), 4937-4944.
104. Craig, E. A.; Marszalek, J., How do J-proteins get Hsp70 to do so many different things? *Trends in biochemical sciences* **2017**, *42* (5), 355-368.
105. Hennessy, F.; Nicoll, W. S.; Zimmermann, R.; Cheetham, M. E.; Blatch, G. L., Not all J domains are created equal: implications for the specificity of Hsp40–Hsp70 interactions. *Protein Science* **2005**, *14* (7), 1697-1709.
106. Genevoux, P.; Schwager, F.; Georgopoulos, C.; Kelley, W. L., The *djlA* gene acts synergistically with *dnaJ* in promoting *Escherichia coli* growth. *J Bacteriol* **2001**, *183* (19), 5747-50.
107. Gialama, D.; Delivoria, D. C.; Michou, M.; Giannakopoulou, A.; Skretas, G., Functional Requirements for *DjlA*- and *RraA*-Mediated Enhancement of Recombinant Membrane Protein Production in the Engineered *Escherichia coli* Strains SuptoxD and SuptoxR. *J Mol Biol* **2017**, *429* (12), 1800-1816.
108. Toutain, C. M.; Clarke, D. J.; Leeds, J. A.; Kuhn, J.; Beckwith, J.; Holland, I. B.; Jacq, A., The transmembrane domain of the DnaJ-like protein *DjlA* is a dimerisation domain. *Mol Genet Genomics* **2003**, *268* (6), 761-70.
109. Kienlen-Campard, P.; Tasiaux, B.; Van Hees, J.; Li, M.; Huysseune, S.; Sato, T.; Fei, J. Z.; Aimoto, S.; Courtoy, P. J.; Smith, S. O., Amyloidogenic processing but not amyloid precursor protein (APP) intracellular C-terminal domain production requires a precisely oriented APP dimer assembled by transmembrane GXXXG motifs. *Journal of Biological Chemistry* **2008**, *283* (12), 7733-7744.
110. Clarke, D. J.; Jacq, A.; Holland, I. B., A novel DnaJ-like protein in *Escherichia coli* inserts into the cytoplasmic membrane with a type III topology. *Molecular microbiology* **1996**, *20* (6), 1273-86.
111. Kelley, W. L.; Georgopoulos, C., Positive control of the two-component RcsC/B signal transduction network by *DjlA*: a member of the DnaJ family of molecular chaperones in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* **1997**, *25* (5), 913-31.

112. Majdalani, N.; Gottesman, S., The Rcs phosphorelay: a complex signal transduction system. *Annu. Rev. Microbiol.* **2005**, *59*, 379-405.
113. Lakhali, F.; Bury-Moné, S.; Nomane, Y.; Le Goïc, N.; Paillard, C.; Jacq, A., DjlA, a membrane-anchored DnaJ-like protein, is required for cytotoxicity of clam pathogen *Vibrio tapetis* to hemocytes. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74* (18), 5750-5758.
114. Ohnishi, H.; Mizunoe, Y.; Takade, A.; Tanaka, Y.; Miyamoto, H.; Harada, M.; Yoshida, S.-i., *Legionella dumoffii* DjlA, a member of the DnaJ family, is required for intracellular growth. *Infection and immunity* **2004**, *72* (6), 3592-3603.
115. Teese, M. G.; Langosch, D., Role of GxxxG motifs in transmembrane domain interactions. *Biochemistry* **2015**, *54* (33), 5125-5135.
116. Gónna, M. W.; Pietras, Z.; Tsai, Y.-C.; Callaghan, A. J.; Hernández, H.; Robinson, C. V.; Luisi, B. F., The regulatory protein RraA modulates RNA-binding and helicase activities of the *E. coli* RNA degradosome. *RNA* **2010**, *16* (3), 553-562.
117. Lee, K.; Zhan, X.; Gao, J.; Qiu, J.; Feng, Y.; Meganathan, R.; Cohen, S. N.; Georgiou, G., RraA: a protein inhibitor of RNase E activity that globally modulates RNA abundance in *E. coli*. *Cell* **2003**, *114* (5), 623-634.
118. Carpousis, A. J., The RNA degradosome of *Escherichia coli*: an mRNA-degrading machine assembled on RNase E. *Annu. Rev. Microbiol.* **2007**, *61*, 71-87.
119. Kaberdin, V. R.; Miczak, A.; Jakobsen, J. S.; Lin-Chao, S.; McDowall, K. J.; von Gabain, A., The endoribonucleolytic N-terminal half of *Escherichia coli* RNase E is evolutionarily conserved in *Synechocystis* sp. and other bacteria but not the C-terminal half, which is sufficient for degradosome assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1998**, *95* (20), 11637-11642.
120. Seo, S.; Kim, D.; Song, W.; Heo, J.; Joo, M.; Lim, Y.; Yeom, J.-H.; Lee, K., RraAS1 inhibits the ribonucleolytic activity of RNase ES by interacting with its catalytic domain in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Microbiology* **2017**, *55* (1), 37-43.
121. Park, N.; Heo, J.; Song, S.; Jo, I.; Lee, K.; Ha, N.-C., Crystal structure of *Streptomyces coelicolor* RraAS2, an unusual member of the RNase E inhibitor RraA protein family. *Journal of Microbiology* **2017**, *55* (5), 388-395.
122. Miczak, A.; Kaberdin, V. R.; Wei, C.-L.; Lin-Chao, S., Proteins associated with RNase E in a multicomponent ribonucleolytic complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1996**, *93* (9), 3865-3869.
123. Py, B.; Higgins, C. F.; Krisch, H. M.; Carpousis, A. J., A DEAD-box RNA helicase in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Nature* **1996**, *381* (6578), 169-172.
124. Murashko, O. N.; Lin-Chao, S., *Escherichia coli* responds to environmental changes using enolase degradosomes and stabilized DicF sRNA to alter cellular morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2017**, *114* (38), E8025-E8034.
125. Liou, G.-G.; Jane, W.-N.; Cohen, S. N.; Lin, N.-S.; Lin-Chao, S., RNA degradosomes exist in vivo in *Escherichia coli* as multicomponent complexes associated with the cytoplasmic membrane via the N-terminal region of ribonuclease E. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2001**, *98* (1), 63-68.
126. Leroy, A.; Vanzo, N. F.; Sousa, S.; Dreyfus, M.; Carpousis, A. J., Function in *Escherichia coli* of the non-catalytic part of RNase E: role in the degradation of ribosome-free mRNA. *Molecular microbiology* **2002**, *45* (5), 1231-1243.
127. Guzman, L. M.; Belin, D.; Carson, M. J.; Beckwith, J., Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol* **1995**, *177* (14), 4121-30.
128. Skerra, A., Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* **1994**, *151* (1-2), 131-5.

129. Michou, M.; Kapsalis, C.; Pliotas, C.; Skretas, G., Optimization of Recombinant Membrane Protein Production in the Engineered Escherichia coli Strains SuptoxD and SuptoxR. *ACS Synth Biol* **2019**, *8* (7), 1631-1641.
130. Geertsma, E. R.; Groeneveld, M.; Slotboom, D. J.; Poolman, B., Quality control of overexpressed membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105* (15), 5722-7.
131. Ernst, O. P.; Lodowski, D. T.; Elstner, M.; Hegemann, P.; Brown, L. S.; Kandori, H., Microbial and animal rhodopsins: structures, functions, and molecular mechanisms. *Chemical reviews* **2014**, *114* (1), 126-163.
132. Kamo, N.; Hashiba, T.; Kikukawa, T.; Arais, T.; Ihara, K.; Nara, T., A light-driven proton pump from *Haloterrigena turkmenica*: functional expression in Escherichia coli membrane and coupling with a H⁺ co-transporter. *Biochem Biophys Res Commun* **2006**, *341* (2), 285-90.
133. Hara, K. Y.; Wada, T.; Kino, K.; Asahi, T.; Sawamura, N., Construction of photoenergetic mitochondria in cultured mammalian cells. *Scientific reports* **2013**, *3*, 1635.
134. Nannenga, B. L.; Baneyx, F., Enhanced expression of membrane proteins in E. coli with a P(BAD) promoter mutant: synergies with chaperone pathway engineering strategies. *Microb Cell Fact* **2011**, *10*, 105.
135. Camponova, P.; Baud, S.; Matras, H.; Duroux-Richard, I.; Bonnafous, J.-C.; Marie, J., High-level expression and purification of the human bradykinin B2 receptor in a tetracycline-inducible stable HEK293S cell line. *Protein expression and purification* **2007**, *55* (2), 300-311.
136. Pliotas, C., Ion channel conformation and oligomerization assessment by Site-Directed spin labeling and Pulsed-EPR. In *Methods in enzymology*, Elsevier: 2017; Vol. 594, pp 203-242.
137. Schiemann, O.; Prisner, T. F., Long-range distance determinations in biomacromolecules by EPR spectroscopy. *Quarterly reviews of biophysics* **2007**, *40* (1), 1-53.
138. Jeschke, G., Distance measurements in the nanometer range by pulse EPR. *ChemPhysChem* **2002**, *3* (11), 927-932.
139. Pliotas, C.; Ward, R.; Branigan, E.; Rasmussen, A.; Hagelueken, G.; Huang, H.; Black, S. S.; Booth, I. R.; Schiemann, O.; Naismith, J. H., Conformational state of the MscS mechanosensitive channel in solution revealed by pulsed electron-electron double resonance (PELDOR) spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2012**, *109* (40), E2675-E2682.
140. Verhalen, B.; Dastvan, R.; Thangapandian, S.; Peskova, Y.; Koteiche, H. A.; Nakamoto, R. K.; Tajkhorshid, E.; Mchaourab, H. S., Energy transduction and alternating access of the mammalian ABC transporter P-glycoprotein. *Nature* **2017**, *543* (7647), 738-741.
141. Wingler, L. M.; Elgeti, M.; Hilger, D.; Latorraca, N. R.; Lerch, M. T.; Staus, D. P.; Dror, R. O.; Kobilka, B. K.; Hubbell, W. L.; Lefkowitz, R. J., Angiotensin analogs with divergent bias stabilize distinct receptor conformations. *Cell* **2019**, *176* (3), 468-478. e11.
142. Bountra, K.; Hagelueken, G.; Choudhury, H. G.; Corradi, V.; El Omari, K.; Wagner, A.; Mathavan, I.; Zirah, S.; Wahlgren, W. Y.; Tieleman, D. P., Structural basis for antibacterial peptide self-immunity by the bacterial ABC transporter McjD. *The EMBO journal* **2017**, *36* (20), 3062-3079.
143. Timachi, M. H.; Hutter, C. A.; Hohl, M.; Assafa, T.; Böhm, S.; Mittal, A.; Seeger, M. A.; Bordignon, E., Exploring conformational equilibria of a heterodimeric ABC transporter. *Elife* **2017**, *6*, e20236.
144. Ackermann, K.; Pliotas, C.; Valera, S.; Naismith, J. H.; Bode, B. E., Sparse labeling PELDOR spectroscopy on multimeric mechanosensitive membrane channels. *Biophysical journal* **2017**, *113* (9), 1968-1978.
145. Ward, R.; Pliotas, C.; Branigan, E.; Hacker, C.; Rasmussen, A.; Hagelueken, G.; Booth, I. R.; Miller, S.; Lucocq, J.; Naismith, J. H., Probing the structure of the mechanosensitive

channel of small conductance in lipid bilayers with pulsed electron-electron double resonance. *Biophysical journal* **2014**, *106* (4), 834-842.

146. Pliotas, C.; Dahl, A. C. E.; Rasmussen, T.; Mahendran, K. R.; Smith, T. K.; Marius, P.; Gault, J.; Banda, T.; Rasmussen, A.; Miller, S., The role of lipids in mechanosensation. *Nature structural & molecular biology* **2015**, *22* (12), 991-998.

147. Chang, G.; Spencer, R. H.; Lee, A. T.; Barclay, M. T.; Rees, D. C., Structure of the MscL homolog from *Mycobacterium tuberculosis*: a gated mechanosensitive ion channel. *Science* **1998**, *282* (5397), 2220-2226.

148. Barriot, R.; Latour, J.; Castanié-Cornet, M.-P.; Fichant, G.; Genevaux, P., J-Domain Proteins in Bacteria and their Viruses. *Journal of Molecular Biology* **2020**.

149. Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J., Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology* **1990**, *215* (3), 403-410.

150. Michou, M.; Stergios, A.; Skretas, G., SuptoxD2. 0: A second-generation engineered *Escherichia coli* strain achieving further enhanced levels of recombinant membrane protein production. *Biotechnology and Bioengineering* **2020**.

151. Lin-Chao, S.; Bremer, H., Effect of the bacterial growth rate on replication control of plasmid pBR322 in *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics MGG* **1986**, *203* (1), 143-149.

152. Paulsson, J.; Ehrenberg, M., Noise in a minimal regulatory network: plasmid copy number control. *Quarterly reviews of biophysics* **2001**, *34* (1), 1-59.

153. Datsenko, K. A.; Wanner, B. L., One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2000**, *97* (12), 6640-6645.

154. Murphy, K. C., Use of bacteriophage λ recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **1998**, *180* (8), 2063-2071.

155. Michou, M.; Delivoria, D. C.; Skretas, G. J. B-p., High-level Production of Recombinant Membrane Proteins Using the Engineered *Escherichia coli* Strains SuptoxD and SuptoxR. **2020**, *10* (15), e3710-e3710.

156. Madeira, F.; Park, Y. M.; Lee, J.; Buso, N.; Gur, T.; Madhusoodanan, N.; Basutkar, P.; Tivey, A. R.; Potter, S. C.; Finn, R. D., The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic acids research* **2019**, *47* (W1), W636-W641.

157. Robert, X.; Gouet, P., Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic acids research* **2014**, *42* (W1), W320-W324.

158. Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Knyaz, C.; Tamura, K., MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution* **2018**, *35* (6), 1547-1549.

159. Stecher, G.; Tamura, K.; Kumar, S., Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) for macOS. *Molecular Biology and Evolution* **2020**.

160. Rzhetsky, A.; Nei, M., A simple method for estimating and testing minimum-evolution trees. **1992**.

161. Zuckerkandl, E.; Pauling, L.; Bryson, V.; Vogel, H., Evolving genes and proteins. **1965**.

162. Nei, M.; Kumar, S., *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford university press: 2000.

163. Saitou, N.; Nei, M., The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution* **1987**, *4* (4), 406-425.

164. Taq, D., Direct random mutagenesis of gene-sized DNA fragments using polymerase chain reaction. *Analytical biochemistry* **1995**, *224*, 347-353.

165. Casadaban, M. J.; Cohen, S. N., Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology* **1980**, *138* (2), 179-207.

166. Baba, T.; Ara, T.; Hasegawa, M.; Takai, Y.; Okumura, Y.; Baba, M.; Datsenko, K. A.; Tomita, M.; Wanner, B. L.; Mori, H. J. M. s. b., Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. **2006**, *2* (1), 2006.0008.
167. Bachmann, B. J. J. B. r., Pedigrees of some mutant strains of Escherichia coli K-12. **1972**, *36* (4), 525.
168. Perrody, E.; Cirinesi, A.-M.; Desplats, C.; Keppel, F.; Schwager, F.; Tranier, S.; Georgopoulos, C.; Genevaux, P. J. P. G., A Bacteriophage-Encoded J-Domain Protein Interacts with the DnaK/Hsp70 Chaperone and Stabilizes the Heat-Shock Factor σ 32 of Escherichia coli. **2012**, *8* (11), e1003037.

Παράρτημα

Νουκλεοτιδικές ακολουθίες όλων των *djlA* γονιδίων που χρησιμοποιήθηκαν

>*Escherichia coli*

ATGCAGTATTGGGGAAAAATCATTGGCGTGGCCGTGGCCTTACTGATGGGCG
GCGGCTTTTGGGGCGTAGTGTTAGGCCTGTTAATTGGCCATATGTTTGATAAA
GCCCGTAGCCGTAAAATGGCGTGGTTCGCCAACCAGCGTGAGCGTCAGGCGC
TGTTTTTTTGGCACCACCTTTTGAAGTGATGGGGCATTTAACCAAATCCAAAGGT
CGCGTCACGGAGGCTGATATTCATATCGCCAGCCAGTTGATGGACCGAATGA
ATCTTCATGGCGCTTCCCGTACTGCGGCGCAAATGCGTTCGGGGTGGGAAA
ATCAGACAATTACCCGCTGCGCGAAAAGATGCGCCAGTTTCGCAGTGTCTGCT
TTGGTCGTTTTGACTTAATTCGTATGTTTCTGGAGATCCAGATTCAGGCGGCG
TTTGCTGATGGTTCACCTGCACCCGAATGAACGGGCGGTGCTGTATGTCATTGC
AGAAGAATTAGGGATCTCCCGCGCTCAGTTTGACCAGTTTTTGGCGCATGATGC
AGGGCGGTGCACAGTTTGGCGGCGGTTATCAGCAGCAAACCTGGCGGTGGTAA
CTGGCAGCAAGCGCAGCGTGGCCCAACGCTGGAAGATGCCTGTAATGTGCTG
GGCGTGAAGCCGACGGATGATGCGACCACCATCAAACGTGCCTACCGTAAGC
TGATGAGTGAACACCATCCCGATAAGCTGGTGGCGAAAGGTTTGGCCGCTGA
GATGATGGAGATGGCGAAGCAGAAAGCGCAGGAAATTCAGCAGGCATATGAG
CTGATAAAGCAGCAGAAAGGGTTTAAATGA

>*Salmonella enterica*

ATGCAGTACTGGGGAAAGATAAATTGGCGTCGCCGTAGCCCTGATGATGGGCG
GCGGCTTTTGGGGCGTGGTCCTGGGTCTGCTGGTGGGCCATATGTTTCGACAA
AGCCCGCAGCCGAAAAATGGCGTGGTTTGCCAACCAGCGGGAACGGCAGGCG
CTGTTTTTTGGCACCACCTTTGAGGTGATGGGCCACTTAACCAAATCAAAGG
ACGGGTGACGGAAGCGGATATTCATATCGCCAGTCAGTTGATGGATCGTATG
AATTTACACGGCGATTACCGTACTGCCGCGCAGAACGCCTTTCGGGTGCGAA
AAGCGGATAATTACCCATTACGTGAAAAGATGCGGCAGTTTCGTAGCGTCTGC
TTCGGGCGTTTTGATCTGATCCGGATGTTTCTGGAAATTCAGATCCAGGCGGC
GTTTGGCCGATGGCTCGCTACACCCTAATGAGCGGGAAGTGCTGTATGTGATTG
CGGAAGAGCTAGGTATTTCCCGCGTACAGTTCGATCAGTTTCTGCGCATGATG
CAGGGCGGCGCGCAGTTTGGCGGCGGTTATCATCAACAGTCCGGCGGCGGCT
GGCAGCAGGCGCAGCGCGGCCCGACGCTGGAAGATGCCTGTAATGTGCTGGG
GGTTAAAACCACCGACGATGCAACCACCATTAAACGCGCTTATCGCAAACCTGA
TGAGCGAGCATCATCCGGACAAACTGGTTCGCGAAAGGTTTACCGCCGGAAAT
GATGGAATGGCGAAGCAAAAAGCGCAGGAAATTCAGAAAGCGTATGAGCTA
ATCAAAGAACAGAAAGGCTTCAAGTGA

>*Klebsiella pneumoniae*

ATGCAGTATTTGGGTAAAGTGATTGGCGTGGCAGTGGCTTTGCTGATGGGT
GGTGGGTTCTGGGGCGTGGTGCTTGGCTTTCTGGTCGGCCATATGTTTGAC
CGGGCGCGCAGCCGCCGTTAAATCTCTTCGCCAATCAGCAGGAGCGTCAG
TCGCTCTTCTTTTCCACCACCTTCGAAGTGATGGGGCACCTGACCAAATCCA
AGGGCCGCGTTACCGAAGCGGATATTCATGTTCGCCAATGTGCTAATGGATC
GCATGAACCTGCATGGCGCCTCGCGCACCGCGGCGCAGCAGGCGTTTCGCG
ACGGTAAGGCCGACAACCTATCCCCTGCGCGAGAAAATGCGTCAGCTGCGCA
GCGTCTGCTTTGGCCGTTTCGATCTGATTCGGATGTTTCTGGAAATTCAGCT
GCAGGCGGCGTTCGCTGATGGCGAACTGCATCCTAACGAACGGGAAGTGCT
GTTTCGTCATTGCCGACGAGCTCGGCATCTCCCGCGCCAGTTCGATCAATTC
CTGCGGATGATGCAGGGCGGCGCCAGTTTGGCGGCGGTTTCGCAGCAGCG
CTCTTATGGCCAGCATGGCGGCAACGCCGGCTGGCAGCAGGCGCAGCGTGG
GCCGACCCTCGAAGATGCCTGCAATGTGCTGGGAGTAAAACCGACCGACGA
CGCGGCGACGGTGAAGCGCGCCTATCGCAAGCTGATGAACGAACATCATCC
GGACAAGCTGGTAGCGAAAGGTCTGCCGCCGGAGATGATGGAGATGGCCAA
ACAGAAGGCCAGGAGATCCAGAAGGCCTGGGAGCTGATCAAAGAGCAGC
GCGGCTTCTGA

>*Enterobacter gergoviae*

ATGCAGTATTGGGGTAAAGTGATTGGCGTGGCGGTAGCATTAAATGATGGGC
AGCGGCTTCTGGGGCGCGCTGCTTGGGCTTATCGTCGGCCATATGTTTGAT
ACGGCGCGGATGCGCAAGCTCAATTTTTTCGGCGGGGCAGCAGGAGCGGCA
GGCGCTGTTTTTTGCCACCACCTTTGAAGTCATGGGTACCTGACTAAATCG
AAAGGTGCGGTGACGGAAGCCGATATTCAGGTGGCCAACGTGCTGATGGAC
CGCATGAACCTCCACGGCGACTCCCGCACCGCGGCGCAGCAGGCGTTTCGC
GTTGGCAAAGCCGATAATTATCCCCTGCGCGAGAAGATGCGCCAGCTGCGC
AGCGTCTGCTTTGGCCGCTTCGATTTGATTAGGATGTTTCTGGAATTCAGC
TGCAGGCGGCGTTTGGCCGACGGCGAACTCCACCCTAACGAGCGCGAAGTGC
TGTACGTGATTGGCGACGAGCTCGGCATCTCCCGCGCCAGTTCGATCAGT
TTATGCGCATGATGCAGGGGGGCGCGCAGTTCGGCGGCGGCTACCAGCAGT
ACTCCGGCACAGGCGGCGGCTACCAGCAGCAGGCCAGCGCGGTCCGACG
CTGGAAGATGCCTGCAACGTGCTCGGCGTGAAGCCCACCGACGATGCCACC
ACCATCAAGCGCGCCTACCGCAAGCTGATGGGCGAGCACCATCCCGATAAG
CTGGTGGCGAAAGGTCTGCCGCCGGAGATGATGGAGATGGCGAAGCAGAA
GGCGCAGGAGATCCAGAGCGCCTACGAGCTGATAAA
AGAGCAGAAAGGCTTTAAATAA

>Yersinia pseudotuberculosis

ATGCGGTATTGGGGAAAACCTGCTCGGTCTGGTATTGGGCGTAATGTATGCT
CCTGGCGTTGTTGGAGCGCTATTGGGGCTACTTGTGGCCATATGGTAGAC
AGGGCGCTTGGCGCAAACGCCGCGGTTTTTTTTGCTGATCAACAGACACGG
CAATCACTTTTTTTCCGTACCACTTTTCAAGTCATGGGGCATTTAACCAAGG
CTAAAGGGCGTGTTACGGAGGTTGATATCCAACCTCGCCAGCCAACCTAATGG
ATAGGATGCAATTACATGGCGCTGCCAGAACAGCGGCACAGCAAGCGTTTC
GTGAAGGGAAAGAAAGCCACTTTCCGTTGCGAAAGACGTTGCAGGAATTC
GCCGTGTTTGTGTTTGGCCGTTTTGACTTAATTCGGATATTTCTGGAAATTC
ATTACAGGCCGCATTTGCCGATGGTTCCTTGCATCCTAACGAGCGTCAAGTG
CTGTATGTGATTGCTGAAGAGTTAGGGATCTCCCGTGGTCAATTCGATCAAT
TCCTGCGTATGTTTCGATGGGGGGCGTCAATTTGGTGGTCATGGAGGGTGGC
AAGGCCAGCAAGGGGGCTATTCCCAAAGTGTTACCAGCGAGCGCCCCAGG
GCCCGACTCTGGAAGATGCCTGTAAAGTCTTGGGGGTAAATAGCAGTGATG
ACAGTGTGGCCATCAAGCGTGCTTACCGTAAGCTAATGGGGGAACATCACC
CGGATAAGCTGGTTGCCAAGGGGTTACCCCCAGAGATGATGGAAATGGCGA
AGCAAAAAGCGCAGGAAATTCAGGCGGCGTATGACTTGATCAAACGTGAGA
AAGGATTTAAGTGA

>Serratia marcescens

ATGCAGTATTGGGGAAAACCTGCTCGGGCGTCATCGTCGCCATCTGGTCTGGC
GCGGGATTCTGGGGGTGTAGTTCTGGGGCTGATTATCGGTCATATGATCGAT
ACGGCGCGCAGCAACAAGCGCAGTCGGGGCTTTTTTCACCGACCAGCAAACG
CGGCAAACGCTGTTTTTCCGCACCACTTTTCAGGTGATGGGCCACCTGACCA
AATCCAAAGGACGCGTCACCGAGGCGGATATTCAGATCGCCAGCCTGTTTA
TGGATCGCCTTCAGCTGCACGGCGAAGCGCGCACCGCGGCGCAGCAGGCGT
TCCGCGAGGGCAAACAGAGCCAGTTCCCGCTGCGTGAGACGCTGCAGCAGT
TCCGCGAGTATCTGTTTTCGGCCGCTTCGATCTGATTTCGGATGTTTCTGGAAAT
TCAGATTCAGGCGGCGTTCGCCGACGGCTCGCTGCACCCGAACGAACGTCA
GGTGCTGTATGTCATCGCCGAAGAGCTGGGCATTTTCGCGCGCGCAGTTTCA
TCAGTTCCTCAGCATGATGGAGGGCGGGCGTCAGTTCGGCGGGCGGTCAGCA
GGGCGGGTATTCGCAGGGCGGCTATCAGCAGGCTCAGCGCGGCCCCGACGC
TCGACGATGCGTGCAAGGTGCTTGGCGTGCGCAGCAGCGACGATGCCGCCA
CCATCAAACGCGCCTACCGCAAGCTGATGAGCGAACACCATCCGGATAAGC
TGGTGGCGAAAGGCTTGCCGCCGAGATGATGGAAATGGCCAAGCAGAAAG
CGCAGGAGATCCAGGCGGCGTACGACCTGATCAAACGCGAGAAAGGTTTTA
AATAA

>Providencia stuartii

ATGCACTATTGGGGCAAATTTATTGGTGTCTACTGGCAATAGCCTCTGGTT
TTGGCATTGTTGGGGCACGCTAATTGGTTTAATTTTAGGGCATGGTTTTGATAA
GGCCTTGGCACAACGTAAGTTTGCTAGTGCAATGAATAAACGTGATCGTCA
GGTTATTTTTTTTCGCCAGTACCTTCCAAATATTGGGTCATCTAACTAAGTCA
AAAGGCCGTGTAACCGAGACAGACATTCAGTTAGCATCAAATTTGATGGATA
GAATGCAAATACATGGGGAAACACGAAAAGCGGCGCAACAAGCGTTTAGGG
AAGGTAAATCACCGGACTTTCCACTACGTGATGTACTGAAGCAATTACGTAT
GGCTTGCTATGGTTCGTTTCGACTTAATTCAGATGTTTCTGAAATTCAGTTA
CAGGCGGCATTTGCCGATGGCAGTTTGAC
CCAAACGAAAGAAAGGTTCTGTTTATTATTGCAGAAGAGCTAGGGATCTCTA
AAACACAATTCGAACAGTTTTTAAATATGATCCAAGGTGGCCGACAGTTTGG
TCACGGCTATTCTCATCAGCAATCAGGCGGATACTATCAATCATCGAATGGC
CCAACCTTGAAGATGCTTGAAGGTACTTGGTGTCTTCTATTAATGATGAAC
CAACGAAAATTAACGGGCGTATCGTAAATTAATGAGTGAACATCACCTGA
TAAGTTGATAGCGAAAGGGTTGCCCCCGAGATGATGGAACCTTGCGAAACA
GAAGGCTCAGTCAATACAAGCGGCTTATGATTTAATCAAAAAGAGCGCGG
CTTCAAATAA

>Proteus mirabilis

ATGCGCTATTGGGGAAAATTATTAGGCCTTATCATCGGTAGTTTTGCCGGGA
TCGGCTTTTGGGGCATTGTGATTGGGGTTTTTCTAGGACACCTTTATGACGT
ACAAAGAAGTAAATTAAGCTATGGTGGGCGCTATAATCGTGATAGACAAGC
CTATTTCTTTGCTGCCACATTCCAAGTCTTAGGGCATTTAACCAAATCCAAA
GGACGAGTGACACAAACCGATATCACATTAGCCAGTACGTTAATGGATAGA
ATGAATTTACATGGGGCAGCACGTCAAGCAGCACAAACAGGCGTTTCGAGAA
GGTAAAGAGGTTGATTTCCCACTTAGAGCCACCTTACAACGTGTTTCGCCAAA
TTTGTGCCGGTCGCCGTGATTTACTGCAGATGTTTCTGGAAATTC AATTACA
AGCCGCATTTGCTGATGGGCAGTTACATCCTAACGAACGTAAAATGCTGTTT
ATTATTATTGATGAGCTCGGATTTTCTCGCGCCCGTTTTGAACATATATTAG
CCATGATGCAGGCGGGGCAAAGTTTTATTATCAACAAGGGCAAATTTATCA
GCCACAACTCAAGGCCCAACGCTTTCTGACGCCTATAAAGTGTTAGGTATT
AAAGAGGGGGATGATGTTAAAACAATAAAAAGAGCTTATCGAAAATTAATG
GGAGAACATCATCCTGATAAATTGGTTGCAAAGGTTTACCACCGGAGATG
ATGGAAATTGCAAACAAAAAGCACAAAGCTATCCAAGTTGCTTACGATTTGA
TTAAAAAAGAAAAAGGATTTTCGTTAA

>Vibrio tapetis

ATGCACATTTTTGGCAAATTTCTTGGCGCTTTTTTTGGTTTACTATTTGGGG
GCCCACTTGGAGCGATGTTTGGCCTATTCTTAGGTCATCAATTTGATAAGGC
ACGCCGCCTTCAACAAGCAGGATTTACGGCTGGAGGAGGATTTTCTCGAGC
GAATAATACAGAGAAAACAAGCCGAGTTTTTTAGAAAGTGCATTTGCCGTTATG
GGGCATGTTGCAAAGCAAAGGTCAAGTAACACAAGAAGAAATTCAGCTC
GCTAGTACCATGATGTCGCGTATGAATTTACATGGTGAACAACGTGCCGCTG
CGCAAACGCATTTTCGCGATGGCAAAGAGACGGGGTTTCCTTTAGAAGAAA
CGTTGCAAAGGTTTCGAGTTTCTTCAGGCGGACGTCATGATTTACTGCAGTT
TTTTCTTGAACCTTCAAATCTCTGCGGCCTTTGCTGATGGGTCACTTCATCCT

AGTGAGCGTGATGTATTACACATTATTGCCCAAGGGCTTGGTTTTTCATCGG
CTCAGTTAGAGCAGCGACTGCAAATGCAAGAAGCGGCATTTAGATTTTCAGC
AAGGTGGTGGCTTTGGTTTCAGATGGCGGCCAACATGGCGGAGCATTTAAGC
AAGCCTCCAGTGCTAATCAAATTTCCGATGCCTTTAAGGTATTAGGCGTTGC
CGAATCTGCGGAATCAAAGGAAGTGAAGAGAGCGTATCGTAAGCTCATGAA
TGAACATCACCCAGATAAGTTGGTTCGCCAAAGGCTTGCCTCCTGAGATGAT
GCAAGTAGCCAAAGAAAAAGCGCAAGAAATTCAAGCGGCTTACGATCTGCT
TAAGAAAGAAAAAGGCTTTAAATAG

>*Pseudomonas putida*

ATGTGGTGGCCAGGCACGGTGATAGGCGTGGGTGCCGGCTTTGCCGTTGCG
AGCATAACCGGGTGCCTTGCTCGGTGCGTTGCTTGGGCAGGCCATCGACCGC
CGGCTGCGCTTGCAAGGCTGGGAAGACATGCGCGAACGCCTGGGTGGGCG
CCCTGCATTACGCGACGACGAGTTGTTGTTTCGTGATGCTCGGGCGCCTGGC
CAAGTGCATGGCCGGGTAGCCGAGCAGCATATCCAGCAGGCGCGTCAGGA
GATGGTGCCTGGACCTGGCCGAGGCAGCCCGTTGCGCGCCATCAATGC
GTTCAACCGTGGCAAGGCGGGCAAGGACCGGCTTGGCGGGCACCTGCGGC
GCATCAGTCAGCAGCCCCACGCGGCGGAAGGTACCTTGCGGGCCTGTTGGC
GCATGGTCTGGGCTGACGGCAAGATGGGCAACAAGGAGCGTGAGTTGCTGC
TGGACTGGGGGCAGAAGCTGGGCATGAGCCGGCGCCAGGTGCAGGCCATG
TCCCTGGAGTACGAGCCGCGCAAGGCCACGGGAGCAGAAAGCGTGCCCATG
ACCTACGCGGCAGCGTTGCGCTTGCTGGCGGTGGACGCAGACACCGACACC
GATAAGGTCAAGCAGGCGTATCGTCGGCTTGTGTCAGCCGGCATCACCCGGAC
AAGCTGGCAGGTACCGGTGCCAGCGAGGCGCAGGTGCGTGAAGCAACCGC
GCGTACCCGTGAGTTGCACCAGGCCTATGCCATGATCCGCAAGCGGCGCGG
CCTTTGA

>*Pseudomonas aeruginosa*

ATGCTCTGGCCCGCTACGCTGATCGGAGCCGGAGCCGGCTGGGCCCTGGCC
AGCATCCCCGGCGCCCTGCTCGGCGGCCTGCTGGGGCAACTGCTGGACCGC
AGGTTGCGCCTGGAGTCTTGGCGCGGCCTGCTGGCGCGCTTGCGCGGGCG
GGCGGTGAACGATGAGGACGACCTGCTGTTTCAGTTGCTCGGCTATCTGGC
CAAGAGCGGCGGGCGGGTGGAGGAGATGCATATCCGCCAGGCGCGCGAGG
AGATGGCGTTGCGCAAGCTCGATAGGCGAGCCAGCGGCGTGCCATCGCGT
CCTTCGGCAAGGGCAAGGCCGCATCGCCCATCTGCAGGCGGAGGTGCGCG
GTCTGAAGGGCGAACGTGCGGAGGCAGTATTGCTCGCCTGCTGGCGGATGG
CCTGGGCTGGCGGCGTGCTCAGCCAGTCGGCGCGACAACTGGTGTGCAAT
GGGGGCGCTGGCTGGGTTGGTCGGCGGAGCGAACGGAACGCTTGTGCGCG
CGGGTCATGCCAAGCGGACGCGCGCTGTCGCCCGGGATAGCTACCGTGAG
GCCCTGCTGCTGCTCGGCGTGGAGGCCGGAAGCGAGCCGGCGCTGATCAA
CGCGCCTATCGCAAGCTGATCAGCCAGCATCATCCGGACAAACTGGCGGGA
GCCGGCGCCAGCGTCGAGCGCGTGCGTGCGGCTACCGAGAAAACCCGTGA
ATTGCAGGCGGCCTACGCCCTGGTCCGAGAGCGTGAGGGGTTCCGCTGA

>Agrobacterium tumefaciens

ATGATGTTTCGATTTTCGCCTGTTTGGCAAATTTTCATCCCTGTGGGAACGGCTGC
TCGGCGCAATCGGCGACGCGGCAGGCAATGCGCTTGGGCGCGTTGTCGAAG
CCATCCGCACCCTGTTTCGAGGGCGACCCGGAAACCCGCCGCAAGGTATCCT
TTTCCGTTGCCATCATTGCACTTTCCGCCAAGATGGCGAAGGCTGACGGCGT
GGTCAACGATGCCGAGGTTCGTGCCTTCCGGCAGATTTTCGATTTCCCGGA
CGAAGAAGCCAAGAACGTGCGCCGTCTTTATAACCTCGCGCGTCAGGACGT
CGCCGTTACGAGGCCTATGCGGAGCGGCTCGCGGGTCTGTGCGGTTCCGGG
TCATGCCAATTGCGAGATGCTGGAAAGCGTCATCGACGGCCTGTTCCACATT
GCCAAGGCCGATGGCCTGATCCACGAGCGGGAACCTGGCCTTCCCTCGGCCGT
ATTGCGGAAATCTTCCGTATCACCGAAGATCATTTCGAAACGATCATGGCGC
GGCATGTGCACATGGACGGTCGCGATCCTTACCGTGTCCTCGGTGTTTCAC
CTTCGGACGACTTCCCTGGATATTCGCAAGCGTTACCGTTCGCTGGTCCCGA
GCACCATCCGGACAAGCTCATTGCGCGCGGCGTGCCGATGGAATTGCATGC
TGCTGCAAATGAGCGTATGGCGGCTCTCAACGCCGCCTATGCGGCCATCGA
GAAAGAACGCCGCGTCGCA

Χάρτες πλασμιδιακών φορέων pSuptoxD, pSuptoxD2.0 και pSuptoxR

